

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Abteilung für Kardiologie und Angiologie
der Albert-Ludwigs Universität Freiburg i. Br.

**Untersuchungen der
Aktivationsmechanismen
des Integrins $\alpha V\beta 3$
anhand von Mutationsstudien in
rekombinanten
CHO-Zellmodellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2006

Von Jelica Heeskens

Geboren in Sarajevo

Dekan
1. Gutachter
2. Gutachter
Jahr der Promotion

Prof. Dr. Christoph Peters
Prof. Dr. Karlheinz Peter
PD Dr. Uwe Martens
2008

1. Einleitung	9
1.1 Integrine.....	9
1.1.1 Fokale Adhäsion	12
1.1.2 Das thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	12
1.1.3 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ –Vitronektinrezeptor	13
1.1.4 Klinische Relevanz der Integrine	16
1.1.5 Aktivierung der Integrine	17
1.1.6 Mutation in der extrazellulären Region der β_3 -Untereinheit des Vitronektinrezeptors	17
1.1.7 Fragestellung und Ziel.....	18
2. Materialien und Methodik.....	20
2.1 Materialien der gentechnischen Arbeiten.....	20
2.1.1 Kultivierung von Bakterien	20
2.1.2 Glycerolstocks	21
2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli	21
2.1.4 Agarose-Gel-Elektrophorese	22
2.1.5 DNA-Restriktionsverdau	23
2.1.6 Gelelution von DNA-Fragmenten	24
2.1.7 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	24
2.1.8 RNA-Konzentrationsbestimmung	25
2.1.9 Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	25
2.1.10 Kultivierung der Zellen	28
2.1.11 Einfrieren von Zellen.....	29
2.1.12.Mutagenese-PCR.....	30
2.1.13 Transfektion von Säugerzellen:.....	33
2.1.14 Subklonierung und Zellsorten	35
2.1.15 RNA-Isolation	36
2.1.16 One-Step-RT-PCR.....	37
2.2 Materialien und Methodik der funktionellen Testung.....	40
2.2.1 FACS-Analyse von stabil transfizierten Zellen.....	40
2.2.2 Flow chamber Versuch.....	46
2.2.3 Zelladhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen:	52
2.2.4 Immunfluoreszenz von adhären Zellen	53
2.2.5 Immunpräzipitation	54
3. Ergebnisse	62
3.1 Etablierung stabil exprimierender Zellen	62
3.1.1 Expressionsüberprüfung und Zellsorten.....	62
3.1.2 Bestätigung der stabilen Transfektion	70
3.2 Überprüfung des Aktivierungszustandes.....	71
3.3 Untersuchung der Rezeptorfunktion.....	72
3.3.1 Adhäsionsversuche	72
3.3.2 Flowchamber	74
3.3.3 Immunfluoreszenz	77

3.3.4 Immunpräzipitation	78
4. Diskussion.....	79
4.1 Diskussion der gentechnischen Ergebnisse	79
4.2. Diskussion der funktionellen Ergebnisse	79
4.2.1 Adhäsionsversuche als statische Prüfung	80
4.2.2 Flowchamber als dynamische Prüfung	81
4.2.3 Immunfluoreszenz	83
4.2.4 Immunpräzipitation	83
4.2.5 WOW-1 Bindung.....	84
5. Zusammenfassung	86
6. Abbildungsverzeichnis	87
7. Literaturverzeichnis	88
8. Lebenslauf	93
9. Danksagung.....	95
10. Publikation	96

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosintriphosphat
$\alpha_v\beta_3$	Vitronektinrezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Anti-FAK	Monoklonaler Mausantikörper IGg ₁ , Klon 4.47
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CAMs	Cell adhesion molecules
cDNA	complementary DNA
CHO	immortale Epithelzelllinie, die aus einer Ovarienkultur des Hamsters hervorgegangen ist
DMEM	Nährlösung (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppeltes Immunosorbent Verfahren (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluorescence Activated Cell Scan Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forwardscatter, Vorwärtsstreulicht im FACS, Maß für Zellgröße
g	Erdbeschleunigung
GFFKR	Hochkonservierte Aminosäuresequenz in der α -Untereinheit
GP	Glykoprotein
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HAMsF12	Nutrient Mixture with L-Glutamine
LB	Luria Broth Base
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger ribonucleic acid
LM 609	Maus anti-human integrin monoclonal antibody
NaOH	Natriumhydroxid
$\text{Na}_3\text{VO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	Trinatriumvanadattrixhydrat
NP40	Detergenz
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese

PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlsg, pH 7,4
PCR	polymerase chain reaction
Pfu-polymerase	Proof reading Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid (Serinproteaseinhibitor)
pp125 ^{FAK}	Focal Adhesion Kinase
RGD	Arg-Gly-Asp
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Sidewardscatter, Seitwärtsstreulicht im FACS, Maß für die Zellgranularität
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vWF	Von Willebrandfaktor

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
l	Liter
min	Minute(n)
Mio	Million(en)
sek	Sekunde(n)
U	Einheit von Enzymaktivitäten
V	Volt

Präfixe

k	kilo	(10 ³)
c	centi	(10 ²)
m	Mili	(10 ⁻³)
μ	Micro	(10 ⁻⁶)
n	Nano	(10 ⁻⁹)
p	Pico	(10 ⁻¹²)

DNA- und RNA- Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Aspargin	Asn	N
Asparginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S

Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle gehören zur Gruppe der Integrine. Im Folgenden sollen die Integrine näher beschrieben und ihre Relevanz veranschaulicht werden.

1.1 Integrine

Integrine gehören zur Familie der Zelloberflächenrezeptoren (CAMs), die mit der zellulären Matrix interagieren. Sie kommen ubiquitär vor und zeigen zellspezifische Expressionsmuster. Neben der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation sind Integrine an der Gewebeentwicklung und –differenzierung, am Krebszellwachstum und der Metastasierung beteiligt. [9, 20, 35]

Integrine sind nichtkovalent verbundene Heterodimere und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. [7, 20] Sie interagieren mit einer Vielzahl von Glykoproteinen, die Bestandteil der extrazellulären Matrix sind oder auch in löslicher Form im Plasma vorkommen. Anhand ihrer Untereinheiten unterteilt man Integrine in α - und β -Untereinheiten. [8]

Die α -Untereinheiten bestehen aus etwa 1100 AS, haben ein MG von 120-180 kD. Die meisten α -Untereinheiten bestehen aus einer leichten und einer schweren Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die leichte Kette hat einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus und einen transmembranären Anteil. Die schwere Kette wiederum liegt komplett extrazellulär vor.

Der Aminoterminus der α -Untereinheiten zeichnet sich durch sieben genetische Wiederholungen aus. Die Struktur ist ein Helix-Schleife-Helix-Motiv und ist für das Festhalten des Calciums verantwortlich. [21]

β -Untereinheiten bestehen aus etwa 800 AS. Das MG mit 90-110 kD ist geringer als das der α -Untereinheiten. Die β -Untereinheiten besitzen am N-Terminus, dem extrazellulären Teil, einen großen loop. In der Nähe der transmembranen Region enthalten sie vier cysteinreiche Domänen, die jeweils etwa 40 AS lang sind. Beide Untereinheiten bestehen in der Membran aus ca. 20-30 AS und besitzen eine cytoplasmatische Region von etwa 20-50 AS.

Jede Untereinheit verfügt über eine große extrazelluläre Domäne, über eine einzelne Transmembrandomäne (TM) sowie über einen kleinen cytoplasmatischen Teil.[20] Aus der Familie der Integrine der Säugetiere sind insgesamt 19 verschiedene α - und 8 β - Untereinheiten identifiziert. 25 Kombinationen aus diesen sind bis jetzt bekannt. [17] Die Kombination der Untereinheiten ist für die Spezifität des Integrins verantwortlich. [16]

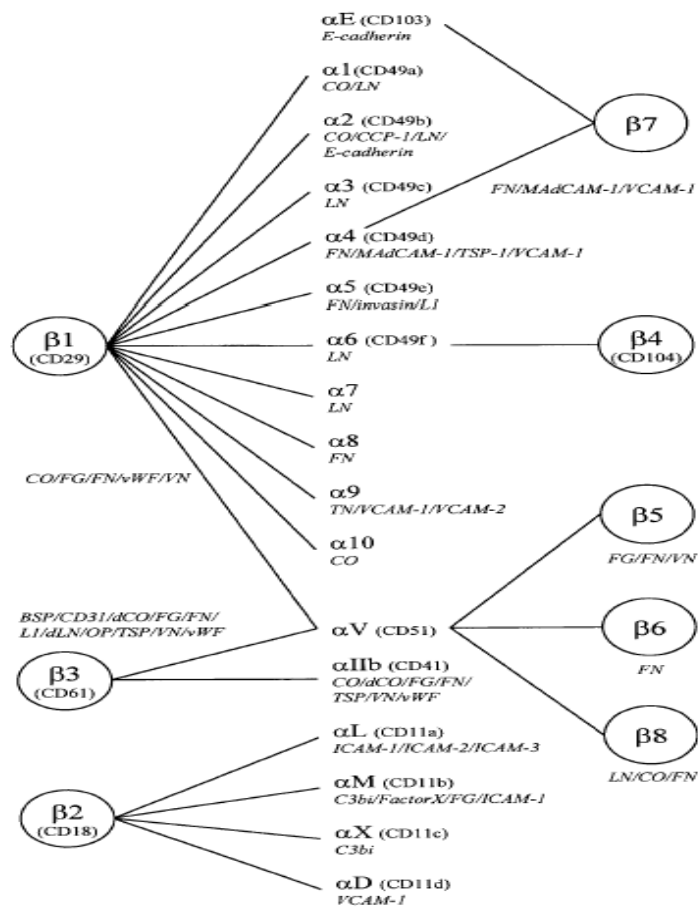


Abbildung 1, Familie der Integrine, Humphries 1998

Die Untereinheiten der Integrine setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Die α -Untereinheit hat in der Regel vier, die I-domänhaltigen Untereinheiten fünf Domänen. Die β -Untereinheiten bestehen aus 8 Domänen. [20]

Im folgenden Abschnitt werden diejenigen Domänen vorgestellt, die Bindungsstellen für die Integrinliganden darstellen.

Die Ligandenbindung erfolgt in erster Linie über bestimmte Bindungsmotive in den Kationenbindungsstellen, insbesondere über die I-Domäne der α - und der β -Untereinheit (Globuläres Kopfstück des Integrins).

Domäne vWF-Typ A

Alle β - und die Hälfte der α -Untereinheiten enthalten die Von Willebrandfaktor-Domänen, die innerhalb der α -Untereinheit I- und bei der β -Untereinheit I-like Domäne genannt werden. [21]

I-Domäne

Die wesentliche Ligandenbindestelle in der α -Kette wurde von Diamond et al. [6] beschrieben. Sie nimmt eine von Willebrand-A-Domänen ähnliche $\alpha\beta$ -Faltung an, mit einem zentralen, hydrophoben β -Faltblatt Bereich, umgeben von α -Helices. Diese Bindungsstelle wird I-Domäne [17, 18, 20] genannt da sie zwischen den β -Faltblatt-Strukturen 2 und 3 des β -Propellers eingefügt ist (inserted).

I-like Domäne der β -Untereinheit sorgt dafür, dass Integrine ohne I-Domäne ihre Liganden direkt binden können. Wenn die I-Domäne der α -Untereinheiten vorhanden ist, dann fungiert die I-like Domäne als ein indirektes Regulationsglied der I-Domäne. [20]

MIDAS

Einige α - wie auch β -Integrine besitzen eine sog. I-Domäne, eine Bindungsstelle für Mg^{2+} und Mn^{2+} , die auch als Metallionenadhäsionsabhängige Bindungsstelle (MIDAS, metal ion-dependent adhesion site) bezeichnet wird. [20]

β -Propeller-Domäne

Der N-terminale Teil der α -Untereinheit beinhaltet sieben Segmente, die in Form einer siebenblättrigen β -Propellerdomäne gefaltet sind. Diese Domäne partizipiert direkt bei der Aktivierung der Integrine, die über keine I-Domäne verfügen.

Hybriddomänen sind β -Sandwichdomänen, die über kovalente Bindungen mit der I-like-Domäne verbunden sind.

Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine

Die zytoplasmatische Domäne der α -Untereinheit ist von Integrin zu Integrin unterschiedlich. Allen α -Untereinheiten gemeinsam ist die hochkonservierte Aminosäuresequenz **GFFKR**.

Bei den β -Untereinheiten ist das Motiv **NPXY** als hochkonservierte Region von Bedeutung. [24]

1.1.1 Fokale Adhäsion

Die Adhäsion der Zellen an andere Zellen oder an die Extrazelluläre Matrix ist essentiell für das Überleben und die Funktion der Zellen. Unter Adhäsion versteht man einen Rezeptor vermittelten Kontakt zwischen der ECM und den Actinfasern des Cytoskeletts.

Diese fokalen Kontakte bestehen aus den intrazytoplasmatischen Anteilen der Integrine und den Actin-Stress-Fasern mit dazwischen liegenden Verbindungsgliedern. Für die Ausbildung der Kontakte werden beide Untereinheiten der Integrine benötigt. Die Verbindungsglieder lassen sich in zwei Klassen unterteilen.

1. Konstruktionsproteine:

Dazu zählen Filamin, α -Actin und Vinculin

2. Regulierungsproteine:

Als wichtiges Beispiel für die vorliegende Arbeit wird an dieser Stelle die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) genannt, die eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung spielt.

1.1.2 Das thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Das Glykoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) gehört zu den β_3 -Integrinen und ist Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula. Es ist mengenmäßig das am häufigst vorkommende

Membranglykoprotein der Blutplättchen ($6-10 \times 10^4$ Rezeptoren pro Thrombozyt). Zentrale Aufgabe des GP IIb/IIIa Rezeptors ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche. Der Fibrinogenrezeptor vermittelt die Verknüpfung der Thrombozyten untereinander (Thrombozytenaggregation). [22] Bei nicht aktivierten Thrombozyten befindet sich der GP IIb/IIIa Rezeptor im niedrig affinen Zustand. In diesem Zustand kann der Rezeptor nur immobilisiertes, nicht aber lösliches plasmatisches Fibrinogen binden. Aktivierung der Thrombozyten führt zur raschen Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Komplexes und zur Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen (aktivierter hochaffiner Funktionszustand). [11]

Der Fibrinogenrezeptor kann auch andere Liganden binden wie den von Willebrand-Faktor, Vitronectin und Fibronectin. Die Bindung erfolgt über eine RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) der Liganden.

Der Fibrinogenrezeptor besteht wie alle anderen Integrine aus einer α - und einer β -Untereinheit. Beide Untereinheiten können, wie schon in Punkt 1.1 beschrieben, in verschiedene Domänen unterteilt werden, die maßgeblich für die Funktion des Rezeptors sind.

Das N-terminale Ende der α -Kette hat die Form eines Propellers. Dieser Propeller ist die Bindungsstelle für RGD Liganden und für Calcium.

Die intrazelluläre α -Kette weist ein GFFKR-motiv (Glycin-Phenylalanin-Phenylalanin-Lysin-Arginin) auf. Dieses Motiv ist dafür verantwortlich, dass der Rezeptor in der inaktiven Form ruht. Sobald Veränderungen in dieser GFFKR Region vorgenommen werden, kommt es zu der Konformationsänderung des Rezeptors und somit zu einer Aktivierung. [23]

1.1.3 Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ –Vitronectinrezeptor

Während GPIIbIIIa spezifisch für Thrombozyten und die Vorläuferzellen der Thrombozyten (Megakaryozyten) ist, findet sich der Vitronectinrezeptor [30] auf vielen verschiedenen Zelltypen wie Thrombozyten [13], Monozyten [20], Endothel- und glatten Muskelzellen [14].

Der Vitronektinrezeptor besitzt die gleiche β_3 -Untereinheit wie der Fibrinogenrezeptor. Er gehört zu der β_3 -Unterfamilie, die auch als Cytoadhäsionsintegrine bezeichnet werden. Er unterscheidet sich aber vom Fibrinogenrezeptor durch die α_v -Untereinheit. Im Gegensatz zu GP IIb/IIIa kommt der Vitronektinrezeptor in sehr geringen Mengen auf Thrombozyten vor und spielt eine untergeordnete Rolle für die Thrombozytenfunktion. Eine wichtige Rolle in der funktionellen Regulation des $\alpha_v\beta_3$ - Integrins kommt der konservierten GFFKR-Region innerhalb des zytoplasmatischen Teiles der α -Untereinheit zu. [4] Der Vitronektinrezeptor hat Liganden wie Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrandfaktor, Thrombospondin, Osteopontin, Plasmin und Prothrombin. Er wird im Gegensatz zum Intergrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, dessen Expression sich auf Thrombozyten und Megakaryozyten beschränkt, auf Endothelzellen, Thrombozyten, Osteoklasten, T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Tumorzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endometriumzellen exprimiert. [20]

$\alpha_v\beta_3$ vermittelt die Adhäsion von Zellen an bestimmten Substraten der extrazellulären Matrix und ist an der Migration von Endothelzellen und Muskelzellen beteiligt.

Der Vitronektinrezeptor ist auch in die Vorgänge der Angiogenese, Apoptose und Proliferation eingebunden.

1.1.3.1 Kristallstruktur des Vitronektinrezeptors

Die Kristallstruktur wurde zum ersten Mal durch die Arbeitsgruppe Xiong et al. [37] 2001 beschrieben.

Der Vitronektinrezeptor wurde anhand der Magnetresonanz- und der Elektronenmikroskopischen Untersuchungen in 3 Aktivierungszustände eingeteilt:

1. Gefaltete Konformation (bent conformation)- Low affinity
2. Gestreckte Konformation mit geschlossenem Kopfteil (extended conformation with closed headpiece)-intermediate affinity
3. Gestreckte Konformation mit dem offenen Kopfteil (extended conformation with open headpiece)- high affinity

Die I-like Domäne des Vitronektinrezeptors steht im engen Kontakt zur β -Propeller-Region.

Die Arbeitsgruppe um Xiong wies weiterhin nach, dass RGD- (Arg-Gly-Asp)haltige Liganden Kontakt zu beiden Untereinheiten (α und β) über die β -Propeller/I-like Domäne aufnehmen. [37]

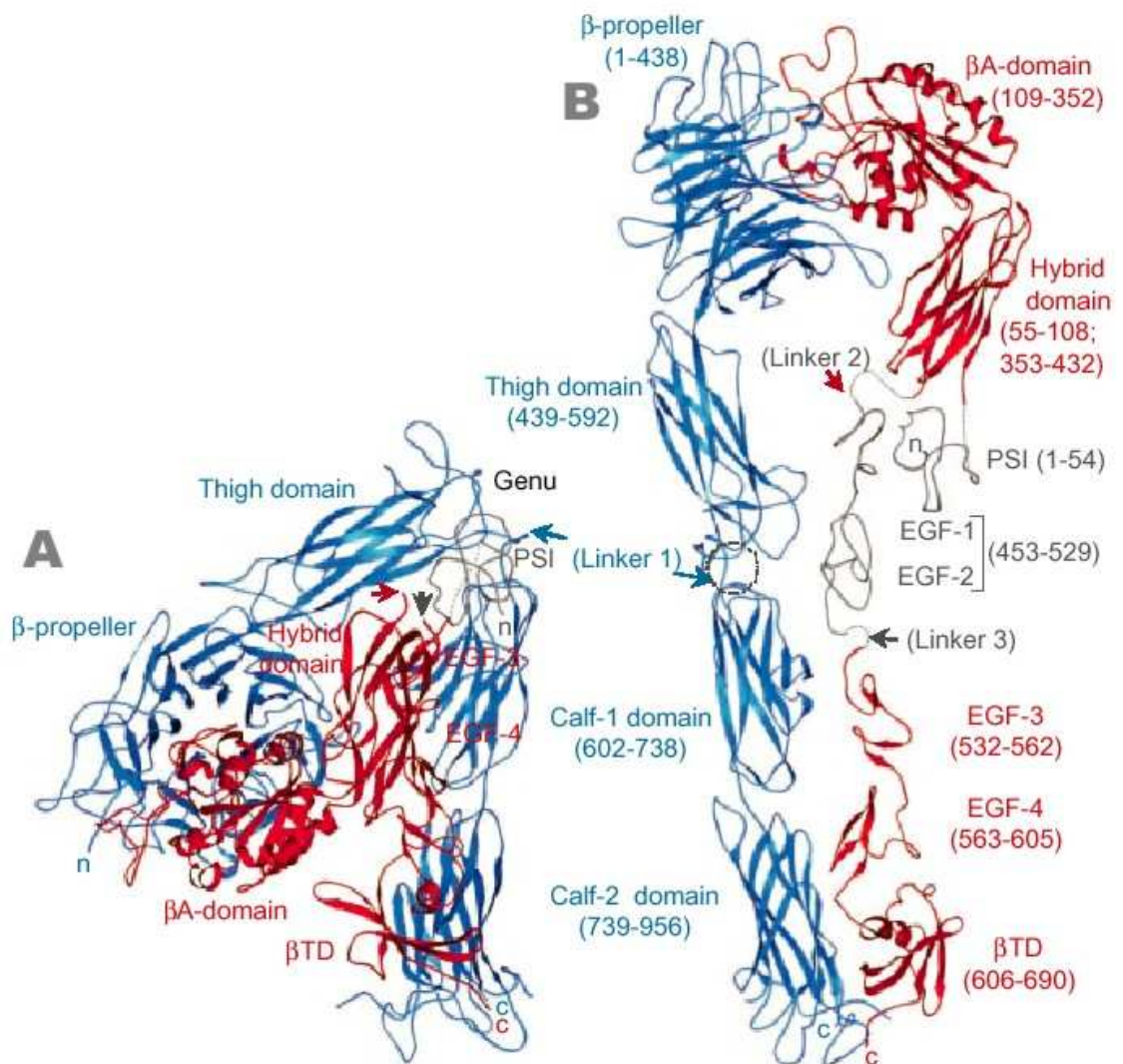


Abbildung 2, Kristallstruktur des Integrins, Xiong, Stehle, 2001

A Bent conformation

B Extended conformation with open head piece

1.1.4 Klinische Relevanz der Integrine

Der Vitronektinrezeptor ist beteiligt an verschiedenen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen. Zu erwähnen sind die Migration der glatten Muskelzellen [33], Angiogenese [26], Tumormetastasierung [1], Hyperplasie der Intima, Osteoporose sowie die Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie [5].

Die Problematik der Restenose hat bedeutende klinische und volkswirtschaftliche Relevanz, da etwa 9% der Patienten mit symptomatischen Stenosen der Koronargefäße sich einer erneuten PTCA wegen einer Restenose unterziehen müssen. [2]

Restenosen nach PTCA entstehen durch elastische Rückstellmechanismen (recoil) und Umbauprozesse der Gefäßwand (remodeling). Bei der Stentimplantation kommt es unvermeidbar zu einer Verletzung der arteriellen Gefäßwand. Dadurch wird eine Neointimabildung induziert, die auch als Ergebnis einer überschießenden Gefäßheilung zu verstehen ist.

In ihrer Veröffentlichung „Potential roles of osteopontin and $\alpha_v\beta_3$ integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty“ [5] stellt die Arbeitsgruppe Panda et al. eine mögliche Verbindung zwischen der Restenose nach Rekanalisierung der Arterien und einer Überexpression des Osteopontins, welches an den Vitronektinrezeptor bindet, dar.

Osteopontin (OPN) wurde 1979 als ein glycolysiertes Phosphorprotein identifiziert, welches eine Bindungsstelle für Integrine aufweist. Panda et al. haben versucht, der Frage nachzugehen, ob die Verletzung der Intima eine Überexpression des OPN nach sich zieht und die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Intima der Patienten nach einer PTCA maßgeblich viel OPN mRNA und Protein exprimiert, was in der Kontrollgruppe, deren Arterien nicht durch Plaque belegt waren, nicht der Fall war. Des Weiteren beobachtete die gleiche Arbeitsgruppe, dass die Interaktion zwischen OPN und dem Vitronektinrezeptor Migration, Invasion sowie weitere Proliferation der glatten Muskelzellen der Herzkranzgefäße zur Folge hatte, was eine Restenose der dilatierten Gefäße bedingt.

An dieser Stelle verdeutlicht sich die Wichtigkeit des Vitronektinrezeptors sowie der mögliche Einsatz der Vitronektinantagonisten in der pharmakologischen Therapie der Arteriosklerose.

1.1.5 Aktivierung der Integrine

Bei der Aktivierung von Integrinen unterscheidet man „inside-out signaling“ und „outside-in signaling“. [19] Über diese Prozesse wird die Integrinaffinität (Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors) und die Integrinavidität (Clustering mehrerer Rezeptoren) reguliert.

Durch das ligandenabhängige „outside-in signaling“ wird die Zellantwort nach einer Adhäsion festgelegt, d.h. die äußere Konformation spiegelt sich auch innerhalb der Zelle und kann dort zu Veränderungen führen.

Die kurzen intrazytoplasmatischen Anteile der Integrine haben eine Schlüsselfunktion in der Aktivitätsregulierung. Es stellt sich die Frage, welcher Teil, welcher Untereinheit für die Aktivierung maßgeblich ist. In ihrer Arbeit „Regulation of integrin affinity through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic subunit“ [24] heben O’ Toole et al. die Schlüsselrolle der β -Subunit bei der Aktivierung von Integrinen hervor. Jedoch erscheint auch die Wechselwirkung zwischen den intrazytoplasmatisch gelegenen Untereinheiten von enormer Wichtigkeit für die Aktivierung der Integrine zu sein.

Die hochkonservierte GFFKR Region der α -Untereinheit ist maßgeblich beteiligt an der Aktivierung der Integrine [28]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Region, die Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_v\beta_3$ auf unterschiedliche Art und Weise regulieren muss. [10]

1.1.6 Mutation in der extrazellulären Region der β_3 -Untereinheit des Vitronektinrezeptors

Durch den Austausch einer einzigen Aminosäure an der Stelle 562 in der extrazellulären, cysteinreichen Region der β_3 -Untereinheit des Fibrinogenrezeptors, hat die Arbeitsgruppe um Kashiwagi schon 1999 nachweisen können, dass diese Mutation die Aktivierung des Rezeptors hervorruft.

Verantwortlich für den neuen Phänotyp ist der Aminosäuretausch T→N (Threonin zu Asparagin). [9]

Laut Kashiwagi [9] führt die T562N Mutation zur Aktivierung von $\alpha_V\beta_3$. Er wies dies nach, indem er die Bindungsaffinität zwischen dem Wildtyprezeptor und Fibrinogen, ohne Aktivierung und nach Aktivierung mit Mangan gemessen hat. Im Vergleich dazu wurde auch die Bindungsaffinität der transfizierten Zellen (T562N) ohne Manganzusatz gemessen und daraus konnte man folgern, dass die eingebrachte Mutation zum ersten Mal zu einer spontanen Aktivierung des Rezeptors geführt hatte.

Frühere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine Deletion der GFFKR-Region zu einer dauerhaften Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt. Im Mittelpunkt stand für uns zunächst die Frage, ob die Deletion dieser Region auch im Vitronektinrezeptor zur Aktivierung führt. Um diese Frage beantworten zu können, haben wir 3 stabile CHO-Zelllinien etabliert, ausgehend von dem Wildtyprezeptor $\alpha_V\beta_3$:

1. Wildtyprezeptor $\alpha_V\beta_3$
2. $\alpha_{V\Delta} \beta_3$ -bei diesen Zellen hat man die GFFKR-Region deletiert
3. $\alpha_{VAA} \beta_3$ - bei diesen Zellen wurde eine FF zu AA Substitution innerhalb der GFFKR Region durchgeführt

Weder die Deletion, noch die Substitution von FF zu AA hat eine Aktivierung des Rezeptors als Folge gehabt. Diese Feststellung wurde durch funktionelle Tests untermauert (FACS, Flow chamber, Adhäsionsversuche, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zwei Integrine $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden müssen. [10]

1.1.7 Fragestellung und Ziel

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, herauszufinden, ob durch die zusätzliche T562N Mutation in der β_3 Untereinheit des Vitronektinrezeptors die deaktivierende Wirkung der Deletion oder Mutation (FF zu AA) der GFFKR-Region aufgehoben werden kann.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob durch das Einbringen der β_3 T562N Mutation eine Wiederherstellung der Kommunikationsfähigkeit von $\alpha_v\beta_3$ mit dem Zytoskelett möglich ist.

2. Materialien und Methodik

Alle Lösungen (z.B. Medien oder Puffer) wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit Aqua destillata angefertigt.

2.1 Materialien der gentechnischen Arbeiten

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

2.1.1.1 Kultivierung von E.coli in Medium

LB Medium	Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, #12795-027
Ampicillin	GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1046
Glucose	ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #6887.1
E.coli	Top 10 Competent Cells, Invitrogen Corporation, USA, C4040-10 XL-10 Gold ultrakompetente Zellen

Das LB Medium wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in dH₂O gelöst und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml addiert und das Medium bei 4 °C gelagert. Zum Herstellen einer Vorkultur wurden zu 5 ml Medium steril filtrierte Glucose (Endkonzentration 0,1 M) hinzugegeben. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine gepickte Einzelkolonie der Bakterien in das Medium überführt und bei 37 °C und 220 rpm für 8 h inkubiert.

Entsprechend den Anwendungen wurden verschiedene E.coli Kulturen in diversen Volumina bei unterschiedlichen Temperaturen für eine entsprechende Zeit inkubiert.

2.1.1.2 Kultivierung von E.coli auf Agar

LB Agar	LB AGAR (LENNOX-L AGAR) GIBCOBRL, Paisley, Scotland, #22700-025
Ampicillin	s.u. 2.1.1.1.
Glucose	s.u. 2.1.1.1.

Zur Agar-Platten-Herstellung wurde LB Agar entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt

2.1.2 Glycerolstocks

Glycerol	SIGMA – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, #G5516
Trockeneis	
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland, #80063

Glycerolstocks erlauben es, Bakterienkulturen dauerhaft haltbar zu machen. Hierzu wurde zu 750 µl einer frischen stationären Bakterienkultur 250 µl steriles Glycerol pipettiert. Diese Mischung wurde schockgefroren (in Ethanol mit Trockeneis) und dann bei – 80 °C gelagert.

2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

QIAprep-spin®-Plasmid-Preparation-Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland, #27106

Zur Präparation und Purifikation von Plasmid-DNA aus E.coli wurden die entsprechenden Protokolle und Systeme der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit Extraktion der DNA und ihrer Bindung an eine Silikat-Membran unter Bedingungen hoher Salzkonzentrationen und niedriger pH-Werte (< 7,5). Unter basischem pH und niedrigeren Salzkonzentrationen kann die gebundene und gewaschene DNA eluiert werden. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Anionenaustausch-chromatographie.

2.1.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #2267.2
50 x TAE Stammlösung	2M Tris (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #T-6791), 5mM EDTA (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #8040), 5,5 % vol % conc. Essigsäure (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #1.00063.1011
6x DNA-Ladepuffer	Blue/Orange 6x Loading Dye, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol, 0,4 % Orange G, 10 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 Promega, Madison, USA, #G1881
DNA Marker	SmartLadder, EUROGENTEC, Seraing, Belgien, #MW-1700-02 (200-10000 bp)

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Variation des Agarosegehaltes kann auf die aufzutrennenden Fragmentgrößen Einfluss genommen werden.

Die Agarose wurde zu 0,5 – 3 % in TAE-Puffer gelöst, bis zur vollständigen Klärung aufgeköcht und in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen. Nach Polymerisation und Abkühlung wurde der Kamm aus dem nun festen Gel gezogen. In die entstandenen Taschen wurden die mit 6xDNA-Ladepuffer versetzten DNA-Proben geladen. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung der Nukleinsäurefragmente wurden Größenstandards aufgetragen (Smart Ladder). Hierauf wurde das Gel bei 5 V/cm Elektrodenabstand laufen gelassen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wurden bei ihrem Lauf in Richtung Anode entsprechend ihrer Größe und Schwere aufgetrennt. .

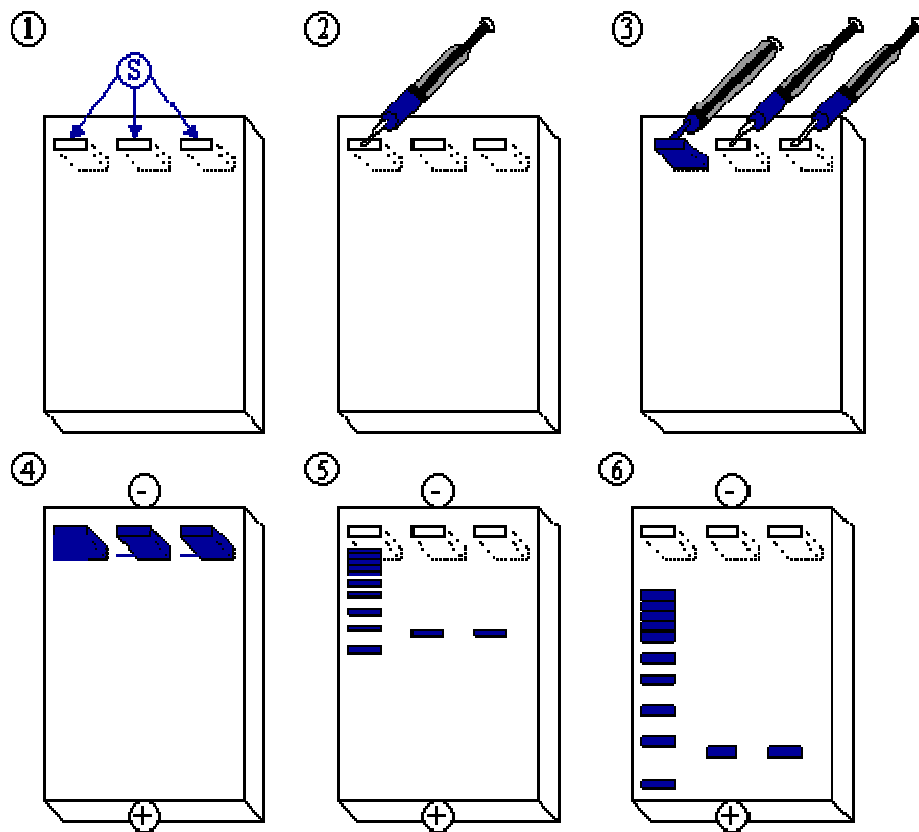


Abbildung 3, Agarose-Gel-Elektrophorese, Quelle: www.wikipedia.de

2.1.5 DNA-Restriktionsverdau

Enzyme	Restriktionsendonukleasen der Firma Roche, Mannheim, Deutschland
Puffer	spezielle 10x-Puffer Systeme, kompatibel zu den jeweiligen Endonukleasen,

Der analytische Restriktionsverdau von DNA dient der Charakterisierung von Plasmiden. Von präparativer Restriktion spricht man bei der Gewinnung von DNA-Fragmenten in größerem Maßstab für die in vitro Rekombination neuer Plasmide. Unter Verwendung von maximal 10% Restriktions-Endonukleasen unterschiedlicher Aktivitäten und Spezifitäten (je nach Applikation) und exakt 10% enzymespezifischen 10 x Puffers wurde der Verdau bei ebenfalls enzymespezifischen Temperaturen für 1–2 h inkubiert. Die Reaktionsbedingungen

folgten den Herstellerangaben. Der Restriktionsansatz wurde anschließend in einem entsprechenden Agarose-Gel ausgewertet.

2.1.6 Gelelution von DNA-Fragmenten

QIAquick®-Gel-Extraction-Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland, #28704

Um gezielt verdaute DNA-Fragmente definierter Größe aus dem Agarose-Gel zu isolieren, wurde das QIAGEN Gel-Aufreinigungs-Kit verwendet. Dabei wurde das selektiv exzidierte Gelstück mit der Zielfragment-Bande zunächst durch Erhitzen bei 50 °C depolymerisiert. Die darin enthaltene DNA (> 100 bp) bindet bei einem pH < 7,5 unter hohen Salzkonzentrationen selektiv an die Silikat-Membran von Ionenaustauscher-Säulen. Gelöste Agarose und andere Verunreinigungen werden nicht gebunden bzw. durch einen Waschschrift entfernt. Die gereinigte DNA wurde anschließend unter basischem pH und niederen Salzkonzentrationen von der Membran eluiert.

2.1.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Materialien:

Die DNA wurde für die Extinktionsmessung 1: 20 verdünnt.

95 µl dd H₂O

5 µl DNA

Küvette für die Messung von Nucleinsäuren, Hellma, Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL, Type nr.105.202-QS

Spectralmax- Spektralphotometer

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde photometrisch nach dem Lambert-Beer-Gesetz bestimmt. Dabei wurde die wässrige DNA-Probe gegen eine Messung von Wasser abgeglichen. Die Messungen der Absorption erfolgten bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 260$ nm und $\lambda_2 = 280$ nm. Bei 260 nm haben Nukleinsäuren, bei 280 nm Proteine ihr Absorptionsmaximum. Einer Extinktion von 1 bei Wellenlänge 260 nm entsprechen $50 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ doppelsträngige DNA, einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ und einer

Oligonukleotidkonzentration von $30 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Die Messung bei 280 nm dient der Detektion von eventuellen Verunreinigungen durch Proteine. [34]

Die teilweise Überlagerung der Absorptionen von Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteinen bei 280 nm kann dazu genutzt werden, die Reinheit einer Nukleinsäure abzuschätzen. Der Quotient E_{260}/E_{280} einer sauberen Nukleinsäure sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. [15]

2.1.8 RNA-Konzentrationsbestimmung

Materialien: siehe DNA- Konzentrationsmessung

Die RNA- Konzentration einer Probe wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die wässrige RNA-Probe wie bei der DNA-Konzentrationsmessung bei 260 nm gegen eine Messung von Wasser abgeglichen.

2.1.9 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die Methode der Polymeraskettenreaktion (PCR, Saiki et al.1988) wurde 1987 von Kary B Mulis [34] entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfache Kopien herzustellen. Diesen Vorgang nennt man Amplifikation und er ermöglicht, dass auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse schnell zugänglich sind.

Grundprinzip der PCR:

Die Vorgänge der Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäurematrize, der Template-DNA. Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide, sog. Primer, verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert von dem 3' Ende aus beginnend den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufigen Primerpaars, forward und revers, kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den zwei Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Schematischer Ablauf einer PCR-Reaktion:

Im ersten Schritt wird die Template-DNA durch die thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA überführt. An diese hybridisieren die Oligonucleotid-Primer. Dieser Schritt wird Annealing genannt. Davon ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase im letzten Schritt die komplementären Stränge (Extension). Durch mehrfache Wiederholung dieses aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation.

Durchgeführt werden die PCR-Experimente in Thermocyclern. Ein Thermocycler besteht aus einem temperierbaren Reaktionsraum, in den die PCR-Proben gestellt werden. Eine automatische Steuerung regelt das zyklische Temperaturprogramm, wobei die jeweilige Temperatur und die Zeit pro Reaktionsschritt sowie die Zyklenzahl individuell programmierbar sind.

Komponenten der PCR:**Templates:**

Als Template wird DANN in Form von rekombinanter DNA in verschiedenen Vektoren oder genomische DNA verwendet. Zur Untersuchung von Transkripten wird zuerst RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und dann amplifiziert (RT-PCR).

Primer:

Die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR sind abhängig von dem Primerdesign. So ist es von enormer Wichtigkeit, dass die Primer weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können. Die Komplementarität zwischen den Primern sollte daher vermieden werden. Die beiden in der PCR eingesetzten Primer sollten gleiche Schmelztemperatur haben, um optimale Versuchsbedingungen einstellen zu können. Die Schmelztemperatur wird nach der folgenden Formel errechnet: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$.

Annealingtemperatur: in der Regel 5°C unter der T_m . Die Primer sollten eine Länge zwischen 18 und 30 Nucleotide haben.

Des Weiteren ist es wichtig, dass man beim Primerdesign beachtet, dass am 3'-Ende Wiederholungen von 3 oder mehr Gs oder Cs vermieden werden.

DNA-Polymerasen:

Alle heute eingesetzten Enzyme sind hitzestabil, um eine automatisierte Durchführung der PCR zu ermöglichen. Es handelt sich vor allem um die Enzyme Taq-Polymerase, Tth-Polymerase und Pfu-Polymerase.

Obwohl die Taq-Polymerase die am häufigsten verwendete ist, wurden in dieser Arbeit Pfu-Polymerasen eingesetzt. Die Pfu-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) hat die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, was bedeutet, dass während der Synthese falsch eingebaute Desoxynucleotide erkannt und entfernt werden (Proofreading). Die Amplifikation mit diesem Enzym hat eine um den Faktor 10 geringere Fehlerquote als bei der Taq-Polymerase [34].

Pfu-Polymerase wird vor allem dann eingesetzt wenn eine möglich niedrige Fehlerquote wichtig ist. Die Pfu-Polymerase hängt im Gegensatz zu anderen Polymerasen kein Adenosin an das 3' Ende an, sodass die entstehenden Produkte glatte Enden aufweisen, was bei der Klonierung der PCR-Produkte in Expressionsvektoren oder bei der Mutagenese PCR von wesentlicher Bedeutung ist.

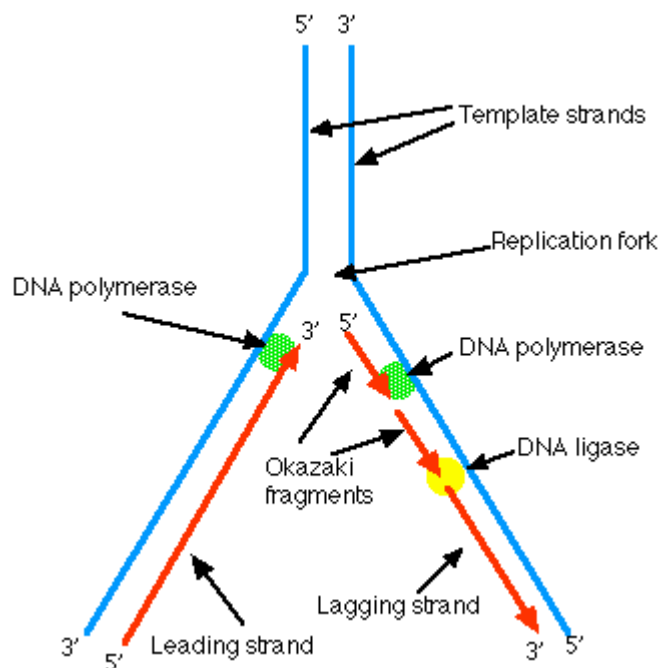


Abbildung 4, Replication Fork, www.bio.davidson.edu

2.1.10 Kultivierung der Zellen

Zellkulturflaschen: Nunclon Surface, NUNC GmbH, Wiesbaden
175 cm² culture area (#178883), 25 ml Medium, 5ml Trypsin
80 cm² culture area (#178891), 15 ml Medium, 3ml Trypsin

CHO-Medium: 230 ml HAMs F12(GIBCO), C_{END} 50%
230 ml DMEM (Cambrex Bio Sciences, Verviers Belgien, #BE12-709) C_{END} 50%
50 ml FCS (Cambrex Bio Sciences, Verviers Belgien, #14801C)
5 ml L-Glutamin (Cambrex B.S., V. Belgien #17605E) 1%
5 ml Penicillin/Streptomycin (Cambrex B. S., V. Belgien #17602E) 1%

Trypsin zum Ablösen von Zellen:

Versene Mixture, Cambrex Bio
Sciences, Verviers, Belgien, #17161E

α V β ₃Medium: CHO-Medium mit Zusatz von:

Geneticin und Zeozin

875 μ l Stammlösung (200mg/ml) Geneticin, Gibco, #11811
1,25 ml Zeozinstammlösung 100 mg/ml, Invitrogen Corporatio, USA, #R250-01

Die adhären in Monolayern wachsenden Zellen werden in Plastik-Kulturflaschen kultiviert. Alle Zellen werden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Begasung gehalten.

Zur Ablösung der Zellen von der Plastikfläche wird das alte Medium abpipettiert und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Dies wird wieder abpipettiert, und anschließend 5ml Trypsin in die Flasche gegeben. Nach 2 Min Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wird das Trypsin durch FCS-haltiges Medium antagonisiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Grundfläche von 0,0625 mm² pro 16 Kleinquadrate gezählt. Um die Zellen weiter zu kultivieren, werden in eine 175 cm² Zellkulturflasche 25ml Zellmedium vorgelegt und ein Anteil der Zellsuspension hinzugegeben.

2.1.11 Einfrieren von Zellen

Cell Culture Freezing Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, #11101011
Cryoröhrchen 2,0 ml	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, #126280

Die Zellen werden von Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert (5 Min, 1000 rpm). Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Konzentration beträgt 5 x 10⁶ Zellen/ml bis 1 x 10⁷ Zellen/ml. Die Zellsuspension sollte dann schnellstmöglich in kryogene Speicherröhrchen aliquotiert und sofort im -80°C Tiefkühlschrank in einem „Mister Frosty“ eingefroren werden, der mit Isopropanol gefüllt eine gleichmäßige Abkühlrate von 1°C pro h gewährleistet. Die Zellen sollten am nächsten Tag im Stickstoffbehälter gelagert werden.

Beim Auftauen der Zellen wird der Behälter schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut. 1ml der eingefrorenen Zellen werden anschließend mit 25ml Medium vorsichtig gemischt. Nachdem die Zellen über Nacht an die Kulturflasche adhären haben, werden die Zellen am nächsten Tag unter dem Mikroskop überprüft und ein Mediumwechsel durchgeführt, um das zellschädigende DMSO aus dem Medium zu beseitigen.

2.1.12. Mutagenese-PCR:

Zirkuläre Mutagenese und Dpn I-Selektion der Mutanten

Diese Methode eignet sich, um Mutationen in nicht zu große Plasmide einzuführen. (<7 kb). Die Mutagenese erfolgt durch DNA-Synthese ausgehend von zwei Mutageneseprimern (forward und reverse). Die Reaktion wird katalysiert durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Nach der Denaturierung erzeugt die Polymerase aus der denaturierten DNA neue Plasmide, die versetzt auf jeder Seite einen Strangbruch enthalten. Durch anschließende Transformation in kompetente Bakterien können so rekombinante Klone entstehen. Da aber durch diese Reaktion auch nicht mutierte Plasmide entstehen, versucht man die Rate der mutierten Plasmide durch den Dpn I- Verdau zu erhöhen. Dpn I spaltet spezifisch methylierte $G^{me6}ATC$ -Sequenzen in der bakteriell erzeugten Matriz, die aber nicht in den mutierten, d.h. in den in vitro hergestellten Kopien vorkommen.

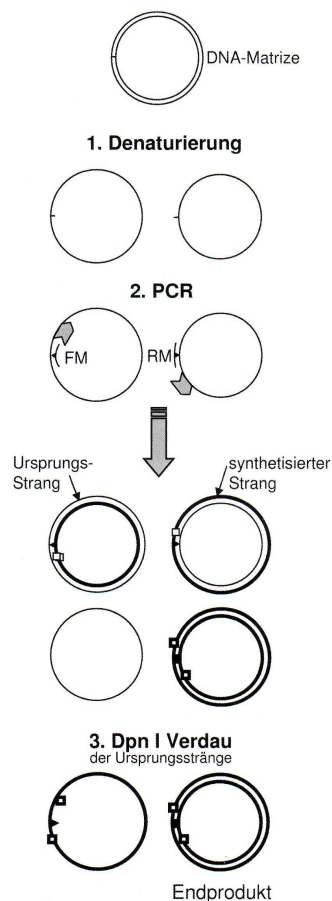


Abbildung 5, Mutagenese-PCR, Gangolf Schrimp: Gentechnische Methoden

Materialien:

Quick change II XL Kit

Stratagene, La Jolla, USA, #200521

5 µl 10x Reaktionspuffer

10 ng dsDNA-Template

125 ng forward primer

125 ng reverse primer

1 µl dNTPmix

3 µl Quick solution

2,5 µl MgCl₂

1 µl Pfu Ultra HF DNA Polymerase(2,5 U/l)

Parameter für den Thermocycler:

<u>Zyklen</u>	<u>Temp</u>	<u>Zeit</u>
1	95°C	1 Minute
18	95°C	50 sec
	60°C	50 sec
	68°C	1Min/kb der Plasmidlänge
1	68°C	7 Min

Transformation:

Benötigte Reagenzien :

Mutagenese-PCR-Produkte nach DpnI-Verdau (1h bei 37°C)

1µl Kontrollplasmid pUC18 (0,01 ng/µl) XL-Gold-Ultracompetent cells Kit,
Stratagene, La Jolla, USA, # 200314

XL-Gold ultracompetente Zellen (45 µl pro Transformation),

XL-Gold-Ultracompetent cells Kit,
Stratagene, La Jolla, USA, # 200314

Beta-Mercapthoethanol mix	XL-Gold-Ultracompetent cells Kit , Stratagene, La Jolla, USA, # 200314
---------------------------	---

S.O.C-Medium	Invitrogen Corporation, Carlsbad,USA, Katalognum.: 15544-034
--------------	--

Pro Transformation wurden mindestens 2 LB-Zeozin Agar Platten vorbereitet
LB-Zeozin-Rezept:

5 g Tryptone	Difco, Beckton Dickinson, USA, #211705
2,5 g NaCl	Merck, Darmstadt, #1.06404.1000
2,5 g Yeast extract	Difco, Beckton Dickinson, USA, #212750
pH auf 7,5 einstellen mit 50% NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, # T197.1

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden 250 µl Zeozin dazugegeben.

Ultracompetente Zellen XL-Gold wurden auf Eis aufgetaut und zu 45 µl in kalte Eppendorftubes aliquotiert. Dazu wurden 2 µl Mercaptoethanol pipettiert und vorsichtig vermischt. Das Ganze wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und alle 2 Minuten durchmischt. Anschließend wurden jeweils 25 µl der Dpn I verdauten Mutagenese-PCR-produkte dazu pipetteiert. Zur Transformationskontrolle (Zellkompetenz wird damit geprüft) wurde ein Ansatz mit 1 ml pUC 18 versetzt (0,01 ng/µl). Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde der Heizblock auf 42° C vorgeheizt und pro Transformationsansatz 500 µl SOC auf 42° C vorgewärmt. Die Tubes wurden aus dem Eis rausgenommen und für 30 Sekunden in den Heizblock gestellt. Durch den Hitzeschock wurde die Bakterienmembran für die Plasmid-DNA durchlässiger gemacht, welche dadurch aufgenommen wurde. Danach wurden die Tubes

nochmals 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 500 µl 42°C warmem SOC versetzt und 1h bei 37°C und 225 rpm inkubiert.

Nach der Inkubation wurden pro Transformationansatz 2 Zeozin-Agarplatten mit den transformierten XL-Gold bestrichen. Die Platten wurden bei 37°C 16 h inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 250 ml LB-medium mit Zeozin in Konzentration von 250 µl gegeben und bei 37°C bei 300 rpm 12-16 h inkubiert.

Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Präp. Kit wurde diese sequenziert.

In dieser Arbeit wurden folgende Sequenzierungsprimer verwendet:

Beta 3 T562N:

Forward Primer

5'CTACTGCAACTGTACCAACCGTACTGACACCTGC 3'

Backward Primer

5`GATGACGTTGACATGGTTGGCATGACTGTGGACG 3`

2.1.13 Transfektion von Säugierzellen:

Die Identifizierung der Nucleinsäuren als Träger der genetischen Information durch Avery, Macleod und McCarty (1944), die Entschlüsselung der DNA durch Watson und Crick (1954) sowie die Entwicklung der Verfahren zur Herstellung rekombinanter DNA ermöglichte die Manipulation und Untersuchung der Genregulation und -funktion. [34]

Alexander et al. beschrieben 1958 zum ersten Mal die Aufnahme freier Poliovirus-DNA durch Säugierzellen. Im Laufe der Zeit konnte die Transfektion verbessert und die Effizienz der DNA-Aufnahme vergrößert werden.

Es werden unterschiedliche Arten der Transfektion unterschieden:

- Chemische Transfektionsmethoden
- Physikalische Transfektionsmethoden
- Biologische Transfektionsmethoden

In dieser Arbeit wurde die biologische Transfektion durch Lipofektion eingesetzt.

Stabile Expression und Genamplifikation

Die Voraussetzung der stabilen Transfektion ist die Integration der transfizierten DNA ins Wirtsgenom.

Ein weit verbreitetes System der stabilen Transfektion ist die Neomycin/Geneticinresistenz, die vom Neoresistenzgen kodierte Aminoglycosid-Phosphotransferase vermittelt wird. Im Anschluss an eine Transfektion werden transfizierte Zellen durch den Selektionsdruck unter Antibiotika isoliert.

Die stabile Transfektion wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet, durch das Medium inaktiviert und die Zellzahl wurde in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Für das weitere Vorgehen wurden Zellen auf folgende Zellzahlen eingestellt:

$2 \times 10^6/\text{ml}$, $1 \times 10^6/\text{ml}$, $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ und $0,2 \times 10^6/\text{ml}$.

Die Zellen wurden dann mit 9 ml Medium ohne Selektionszusätze auf 100 mm Petrischalen gegeben. Die Zellen durften solange im Brutschrank bei 37°C wachsen bis 70 bis 80 % der Schalen konfluent waren.

Die DNA, die es zu transformieren galt, wurde vorbereitet und für jeden Ansatz waren 10 µg Plasmid-DNA notwendig. 100 µl Superfect wurden mit der DNA vermischt und dann auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen 5 bis 10 Minuten in doppelter Menge HAMSF 12 bei RT belassen.

Der Mastermix wurde mit 8 ml CHO-K1 Medium aufgefüllt und 12 h im Brutschrank inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, wobei diesmal das Selektionsmedium mit Antibiotikazusatz (Geneticin und Zeozin) eingesetzt wurde.

Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und mit 15 ml Selektionsmedium vermischt. Die Mischung wurde in unterschiedlicher Quantität auf 15 100 mm Petrischalen verteilt. Die Zellen wuchsen im Brutschrank solange bis sich einzelne Kolonien gebildet haben und als weiße Punkte für das bloße Auge sichtbar geworden waren.

Die Klone, die auf den Platten sichtbar waren, wurden mit sterilen Pipettenspitzen im Selektionsmedium auf 6-well Platten gebracht, wo sie bei 37°C wachsen konnten.

Pro Zelllinie wurden fünf 6well-Platten kultiviert.

Alle Klone wurden im FACS mit dem LM 609 Antikörper getestet und die erfolgsversprechendsten Klone im Selektionsmedium weiter kultiviert.

2.1.14 Subklonierung und Zellsorten

Um wirklich reine Klone zu erhalten, sind wir dazu übergegangen, die einzelne Klone subzuklonieren und diejenigen weiter zu kultivieren, die die besten FACS-Ergebnisse hatten. Dazu haben wir Zellen, die bis dahin in Zellflaschen kultiviert worden sind, im Selektionsmedium auf 100 mm Petrischalen gebracht und kultiviert, bis einzelne Zellklone sich an der Oberfläche der Petrischalen als weißliche Zellhaufen organisiert hatten. Diese wurden dann mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und jeder einzelne Klon wurde dann separat weiter kultiviert.

Als sich die normale Subklonierung nicht als sehr erfolgreich erwiesen hatte, wurden die transfizierten Zellen in einem High Speed Cell Sorter gesortet.

Zellsortierung:

Mit dem Zellsorter, einem spezialisierten FACS Gerät, lassen sich Subpopulationen von Zellen physisch von der Hauptpopulation trennen.

Bei Zellsortern ist die Flusskammer in einen piezoelektrischen Kristall eingebettet, der in Abhängigkeit von einem daran gekoppelten akustischen Übertreger vibriert. Die Vibration des Kristalls wird dann auf die Flusskammer übertragen und führt zu einer Knotenbildung im Flüssigkeitsstrahl und schließlich zu einem Abbruch des Flüssigkeitsstrahls in Einzeltropfen.

Um den Sortiervorgang zu beginnen, wird ein Messfenster gewählt, mit dem der Computer nach Zellen suchen kann, die den vorgegebenen Einschlusskriterien entsprechen. Wenn dies der Fall ist, dann gibt das Gerät eine elektrische Ladung einer bestimmten Polarität an den gesamten Flüssigkeitsstrom weiter.

Am Lasermesspunkt bestimmt der Computer, ob eine Zelle die Sortierungskriterien erfüllt oder nicht. Sobald der Tropfen sich in einer Geschwindigkeit von 10 m pro Sekunde weiter nach distal bewegt, gelangt er in ein elektrostatisches Feld, das von zwei geladenen Platten erstellt wird. Eine Platte ist positiv und die andere negativ geladen. Der geladene Tropfen wird von den gegensätzlichen Ladungen angezogen und damit von dem Hauptflüssigkeitsstrom abgelenkt. In der Richtung der Ablenkung kann ein Sammelgefäß platziert werden. Die auf diese Weise gesammelte Zellen sind steril.

2.1.15 RNA-Isolation

Starke Denaturierungsmittel stellen die beste Methode dar, zelluläre RNasen zu inaktivieren und intakte RNA zu isolieren. DNA verbleibt in der Interphase und läßt sich damit von RNA trennen.

TRI Reagent TM	Sigma Aldrich, USA, T 9424
1-Bromo-3-Chloropropane	Sigma Aldrich, USA, B 967 3
99% Isopropanol	Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, Art.Nr. 6752.3
75% Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland, Art.Nr. 8008
PBS	
Sterile Eppendorftubes	

Eine konfluente große Zellflasche wurde mit PBS gewaschen und die Zellen mit einem Zellschaber und 10 ml PBS geerntet, in 15 ml Falcons übertragen. Daraufgehend bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die so gebildeten Pellets wurden in 1 ml PBS resuspendiert und in sterile Eppendorf tubes übertragen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, diesmal mit 13000 rpm für 5 Minuten in der Tischzentrifuge, wurde der Überstand verworfen und die Pellets wurden in 1 ml 4° C kaltem TRI-Reagenz resuspendiert. Dieser Ansatz blieb 5 Minuten bei RT stehen, um die komplette Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu gewährleisten. 0,2 ml 1-Bromo-3chloropropane pro 1ml TRI-Reagenz wurden dazugegeben und 15 Minuten „gevortext“. Anschließend wurden die Ansätze erneut 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt mit

10600 rpm für 15 Minuten bei 4° C wurde durchgeführt. Dadurch kam es zu einer Dreischichtung der Ansätze in die wässrige Phase (RNA), Interphase (Lipide und DNA) und organische Phase (Proteine).

Die wässrige Phase wurde in frische Eppendorf tubes übertragen, 0,5 ml Isopropanol pro 1ml TRI-Reagenz zugegeben und anschließend gevortext. Daraufhin wurden die Proben 10 Minuten bei RT inkubiert, dann bei 10600 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, blieb die RNA als Pellet zurück. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol pro 1 ml TRI Reagent gewaschen, anschließend gevortext und bei 7500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 µl PCR-Wasser aliquotiert.

Die RNA- Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.1.16 One-Step-RT-PCR

Im Unterschied zu Two-step-Variante werden bei der one step RT-PCR die reverse Transkription und die PCR in einem Gefäß durchgeführt. Da einer der beiden Primer in der Reaktion für die cDNA- Erststrangsynthese verwendet wird, sind sequenzspezifische Primer eine wichtige Voraussetzung für die One-step-PCR [34]. Durch optimierte Kit-lösungen können weitere Schritte eingespart werden. So enthält der One-Step RT-PCR-Kit (Qiagen), der in dieser Arbeit verwendet wurde, eine Enzymmischung bestehend aus 2 neuartigen Reversen Transkriptase (Omniscript und Sensiscript) und eine Hot-Start-DNA-Polymerase (chemisch modifizierte Taq-Polymerase).

Durch eine 15-minütige Inkubation bei 95°C im Anschluss an die reverse Transkription wird die HotStartTaq DNA-Polymerase aktiviert und gleichzeitig die beiden Reversen Transkriptasen inaktiviert. Dieser Ein- und Ausschalter erlaubt somit eine zeitliche Trennung der beiden enzymatischen Reaktionen so dass eine gegenseitige Beeinflußung der Enzyme somit ausgeschlossen wird. [34, 36]

One Step RT-PCR-Kit, Qiagen, #210210

Drei Ansätze: 1. α V β 3 T562N

2. α Del β 3 T562N

3. α AA β 3 T562N

Reaktionsansatz:

1 μ l (50ng/ μ l) RNA

3 μ l (10pmol/ μ l) primer forward (beta3-T562N-for) bei Metabion International bestellt

5`-AGT ACT GCG AGT GTG ACG ACT T-3`

3 μ l (10 pm/ml) primer riverse (beta3-T562N-rev) bei Metabion International bestellt

5`-CAG TGT CCT TAA GCT CTT TCA CT-3`

10 μ l 5x Qiagen Q-Solution

10 μ l 5x Qiagen One –Step RT-PCR buffer

19 μ l PCR-Wasser

2 μ l dNTP mix

2 μ l Quiagen RT-PCR Enzyme mix

RT(Reverse Transkription): 30 min 50°C

15 min 95°C

Dann:

PCR mit 40 Zyklen: 1 min 94°C

1 min 50°C

1 min 72°C

Anschließend: 10 min 72°C

Das PCR- Produkt wurde bis zum Weiterverarbeiten bei 4°C gelagert. (Aufreinigung des PCR- Produktes mit Qiagen Quick Spin Column. Das Produkt wurde sequenziert durch die Firma Medigenomix.

2.1.17. Aufreinigung des PCR-Produktes:

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen, mit dem QIAquick Spin Purification Kit mittels einer Zentrifuge.

QIAquick PCR Purification Kit (50), Cat.No.28104

QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

Die Aufreinigung ist von großer Bedeutung für die Sequenzierung des PCR-Produktes, weil dadurch das Produkt von den Primern, überschüssigen Nucleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt wird.

2.2 Materialien und Methodik der funktionellen Testung

2.2.1 FACS-Analyse von stabil transfizierten Zellen

2.2.1.1 Aufbau, Arbeitsweise des FACS Gerätes

Fluorescence Activated Cell Scan, Durchflusszytometer: Becton Dickinson
FACSCalibur, Heidelberg, Deutschland.

Es handelt sich bei der Durchflusszytometrie um die Messung zellulärer Eigenschaften während der Bewegung in einem Flüssigkeitsstrom, der fest installierte Detektoren passiert. Die Durchflusszytometrie erlaubt eine rasche qualitative und quantitative multiparametrische Analyse heterogener Zellpopulationen auf einer Einzellbasis [31].

Durchflusszytometer arbeiten überwiegend mit optischen Messprinzipien, und die Ergebnisse beruhen auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter von jeweils einer einzelnen Zelle. Voraussetzung ist, dass die Zellen als eine Suspension von Einzelzellen vorliegen.

Das Anwendungsspektrum reicht von der Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis zu funktionellen Untersuchungen wie beispielsweise intrazellulären Stoffwechselvorgängen. Diese Entwicklungen stammen im Wesentlichen aus den Laboratorien von Herzenberg (Stanford, USA, Charakterisierung und Isolierung von T- und B-Lymphozyten), von Göhde und Dittrich (Münster, Zellproliferation), Kamensky (Boston, Identifikation von Tumorzellen) und von Valet und Kachel (München, Erarbeitung multiparametrischer zellulärer Funktionsanalysen).

Durchflusszytometrische Diagnostik

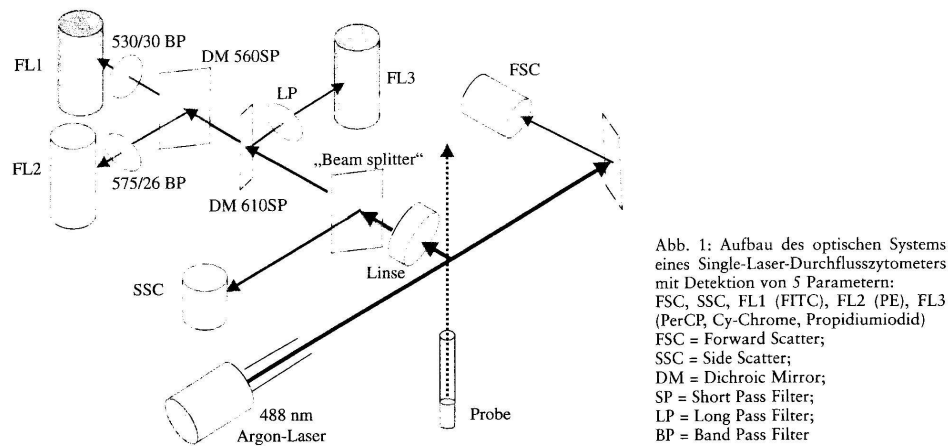


Abbildung 6, FacsScan, Durchflusszytometrische Diagnostik

maligner hämatologischer Erkrankungen, 2001 ecomed Verlagsgesellschaft

Aufbau eines Durchflusszytometers:

Das Durchflusszytometer funktioniert indem es die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom als Einzelpartikel durch einen Lichtstrahl führt, der von einem Laser hergestellt wird. Nachdem die Zellen in Kontakt mit dem Laserstrahl gekommen sind, werden Lichtphotonen von den Zellen gestreut und emittiert. Das gestreute Licht wird durch eine Serie von Filtern und Spiegeln in die konstituierenden Wellenlängen aufgespalten. Danach fällt das Licht auf spezifische Detektoren, die elektrische Impulse auslösen, die proportional zur Menge des Lichts sind, das auf den Detektor trifft. Jedes Analogsignal wird in ein Digitalsignal umgewandelt, eine Zahl, die in einer Häufigkeitsverteilung oder in einem Histogramm dargestellt werden kann.

Die einzelnen 3 Komponenten eines Durchflusszytometers lassen sich in 3 Kategorien aufteilen:

- **Flüssigkeitsstrom** einschließlich des Zellflusses, der assoziierten Flüssigkeitsströme und Hydraulik
- **Optik** einschließlich Lichtquellenoptik, Streu- und Fluoreszenzlichtdetektoren

- **Computersystem**, die Elektronik, die für die Signalverarbeitung, Datensammlung und Datenanalyse verantwortlich ist.

Um Zellen analysieren zu können, ist ein hochgradig kontrollierter **Flüssigkeitsstrom** erforderlich, der die exakte Lage der Probe in den 3 Dimensionen herstellen und erhalten soll. Dies wird vom Probentransportsystem erreicht, indem eine meist isotone Flüssigkeit unter Druck durch einen Konus gepresst wird, der für die Herstellung eines laminaren Flusses ausgelegt ist. Durch die schmale Öffnung des Konuses tritt die Flüssigkeit in einer hohen Flussrate aus. Die in einer eigenen isotonen Flüssigkeit erhaltene Probe wird mit einem hohen Differenzialdruck durch eine Einführdüse eingebracht. Der durch den Konus hervorgerufene lineare Fluss führt zu einer hämodynamischen Fokussierung des Probeneinstromes im Zentrum des Sheatfluids. So entsteht ein koaxialer Strom innerhalb eines Flüssigkeitsstromes. Unter diesen Bedingungen mit einem optimierten Differenzialdruck ist der Durchmesser des Probenflusses nicht größer als die Zelle, die er enthält.

Optik:

Erstens ist das Laserlicht kohärent; alle Lichtquellen verlaufen parallel. Zweitens ist das Laserlicht monochromatisch, d.h. von einer einzigen Wellenlänge oder Frequenz, die eine bestimmte Farbe präsentiert.

Sobald eine Zelle im Flüssigkeitsstrom von dem Laser geschnitten wird, treten unter der Voraussetzung, dass sich Fluorochrome in oder auf der Zelle befinden, zwei Lichtreflexionen ein. Das Licht des Lasers wird durch die Zelle um 360° gestreut. Kurz zusammengefasst, wenn das Licht, das entlang der Achse des Lasers gestreut wird, in einem Detektor gemessen wird, kann man einen Parameter, der Vorwärtsstreulicht (FSC) benannt ist, bestimmen. Die Menge dieses Lichtes ist proportional zur Größe der Zelle bzw. des Partikels.

Wenn das gestreute Licht rechtwinklig zum Laserstrahl gemessen wird, dann heißt der gemessene Parameter 90° Lichtstreuung oder Seitwärtsstreuung (SSC). Empirisch konnte gezeigt werden, dass die SSC vorwiegend aus dem Licht besteht, das an internen Strukturen der Zellen reflektiert worden ist. [31] Deswegen korreliert dieser Parameter mit der Zellgranularität.

Das zweite Lichtereignis am Laserabfragepunkt wird durch Fluorochrome verursacht, die auf oder in der Zelle das Laserlicht absorbieren und Licht mit einer niedrigen Energie reemittieren. Diese Eigenschaft wird Fluoreszenz genannt. Das Licht, das von einem fluoreszierenden Ereignis produziert wird, wird um 360° gestreut. Das Licht wird von dem gleichen optischen System aufgenommen wie das SSC bei 90° . Das vielfarbige Licht gelangt in die Detektionskammer das Seitwärtsstreulicht in der Exzitationswellenlänge und das Fluoreszenzlicht in höheren Wellenlängen.

Die Menge Licht oder die Anzahl der Photonen ist proportional zur Menge der Fluorochrome. Umso mehr Fluorochrom vorhanden ist, umso mehr Licht wird emittiert.

Elektronik und Computersysteme:

Die Lichtphotonen werden in elektrische Impulse umgewandelt, die proportional zur Größe und Anzahl der gemessenen Photonen sind. Hier handelt es sich um Analogsignale, die dann in Zahlen oder in digitale Signale konvertiert werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten der Sammlung digitaler Daten: Histogramm und Listmode. Im Histogramm werden die Daten als fixe Parameter gemessen und in Häufigkeitsverteilungen abgespeichert, bei denen die Größe des gemessenen Parameters auf der Abszisse und die Anzahl der Zellen auf der Ordinate dargestellt sind.

Im Listmode hat man eine Matrix, die alle gesammelten Daten der untersuchten Zellen enthält. Die Liste kann so bearbeitet werden, dass Histogramme oder Dot plots entstehen, die man mehrmals unter unterschiedlichen Aspekten auswerten kann.

Fluoreszenz und Fluorochrome:

Jedes Fluorochrom besitzt ein individuelles Absorptionsmuster und Emissionsmuster. Typischerweise wird von Argonlasern eine Anregungswellenlänge von 488 nm produziert. Das Fluorochrom muss das Licht bei einer Wellenlänge emittieren, die ausreichend länger ist als die Anregungswellenlänge ist, so dass zwei Farben von einer Zelle detektiert werden

(SSC und das Fluoreszenzsignal), die optisch mit selektiven Filtern separiert werden können.

Das am häufigsten verwendete Fluorochrom für die Fluoreszenz ist Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), das ein Absorptionsmaximum bei 494 nm hat.

2.2.1.2 Auswertung

Für die Auswertung der gespeicherten Daten stehen im Wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung:

Dotplot: Hier werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen, wobei jede einzelne Zelle als ein Punkt dargestellt wird. Dies eignet sich besonders für die Darstellung von FSC/SSC, wobei einzelne Zellpopulationen gut anhand ihrer Größe und/oder Granularität abgegrenzt werden können.

Histogramm: Hierbei wird die Häufigkeitsverteilung in einer Probe dargestellt. Auf der Y-Achse wird die Häufigkeit, welche von der Zahl der gemessenen Zellen abhängt, also nur relativ ist, und auf der X-Achse die einzelnen Kanäle, entsprechend der relativen Fluoreszenz, SSC oder FSC, aufgetragen. Für die weitere Auswertung kann man entweder den Mittelwert (mean fluorescence) verwenden, welche aber insbesondere bei logarithmischen Messungen sehr anfällig für Ausreißer ist. Oder man kann den Prozentsatz der Zellen bestimmen, die einen bestimmten relativen Wert übersteigen.

2.2.1.3 Verwendete Materialien

Mit Trypsin geerntete Zellen in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}

FITC gekoppelter AK LM 609
Cellfix (BD)

Chemicon International, # 25020651
BD Bioscience Belgium,
#0503810005

Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in einer Zählkammer auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. 50 μ l der Zellsuspension wurden 20 Minuten lang mit 20 μ l AK LM 609 im Dunkeln inkubiert und danach mit 250 μ l Cellfix fixiert. Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte mit der Cellquest Software.

WOW-1 Experimente:

WOW-1 Antikörper

Primärantikörper 15 μ l WOW-1 in PBS

50 μ l Zellen, 2×10^6 /ml

Sekundärantikörper Alexa -488-conjugated goat anti mouse IgG

50 μ l Zellen in PBS wurden bei RT 30 Min mit WOW-1 inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde für weitere 30 Min bei 4°C auf die Zellen gegeben. Danach erfolgte die Messung wie oben beschrieben.

2.2.2 Flow chamber Versuch

Mit dem Modell der Flow chamber haben wir das neu transfizierte Zellmodell in vitro unter nahezu physiologischen Bedingungen testen können. Durch die Veränderung und Anpassung der Flussrate konnten wir die venösen und die arteriellen Scherraten nachahmen, welche normalerweise in vivo in den menschlichen Gefäßen vorhanden sind.

Die Grundidee, die sich hinter der Flow chamber verbirgt, ist, dass das Adhäsionsverhalten der Zellen innerhalb einer dynamischen Kammer mit genau definierten Flussraten untersucht werden kann.

Zusammensetzen der Flow chamber :

Folgende Bilder stammen aus dem Labor Dr. Peter: Schallner, Heeskens 2006:

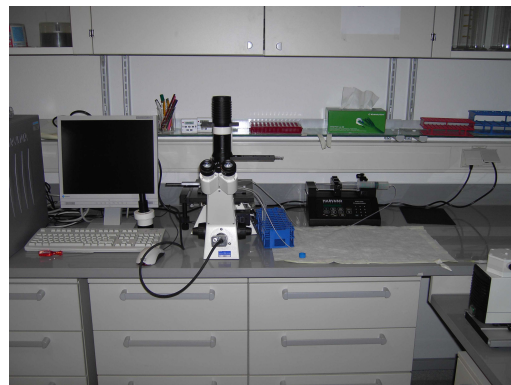


Abbildung 7, Flow chamber Arbeitsplatz

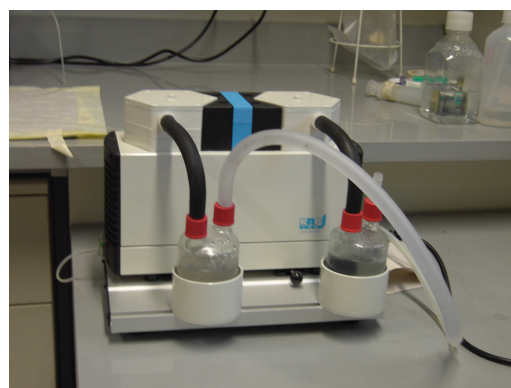


Abbildung 8, Vakuumpumpe(h)



Abbildung 9, Harvardpumpe mit 50 ml Perfusorspritze(i)

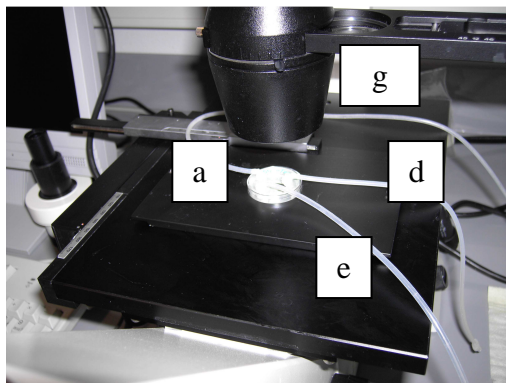


Abbildung 10, Komponenten der Flow Chamber

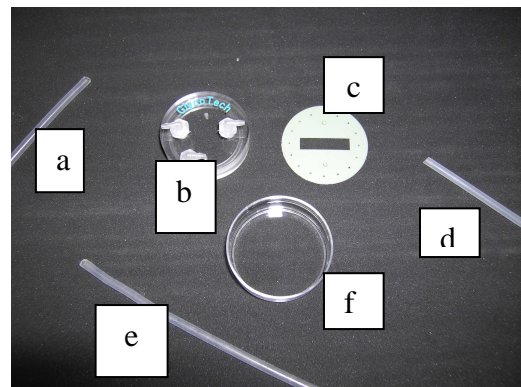


Abbildung 11, Komponenten der Flow Chamber

Flusskammer (b), Schlauchsysteme (a, d)

Kammergröße (c)

Pumpe (i)

50 ml Spritze

Kamera

Circular Parallel flow chamber,

Glycotech Rockville, USA, #11930

Gasket C Dicke 0,0254 cm, Breite
0,5 cm

PHD 2000 programmable Harvard
Apparatus, Holliston, USA, #70-2002

Perfusorspritze OPS 50 ml

B.Braun,Melsungen, #8728810F

B/W-CCD-Camera, AVT-BC 11/AP,
#501784, AVT-Horn Videosysteme
für die Mikroskopie, Aalen

Computersoftware	Let`s edit, Canopus Inc.
Mikroskop (g)	Zeiss Axiovert 25, HBO 50
Vakuumpumpe (h)	KNF-Lab Labport, Neuberger, Freiburg, #N820.3FT.18
35 mm Petrischalen (f)	Corning 35 mm TC-treated culture dish, #430165, DOW Corning Inc.,USA
PBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline with Ca and Mg
BSA	Bovine serum albumine, fraction V, standard grade, ph 7.0, Serva, Heidelberg, #11930
Fibrinogen	Fibrinogen FIB2, Enzyme Reearch Labaratories, South Band , IN, USA

Die Flusskammer setzt sich zusammen aus zwei Plastikflächen, die durch ein Gummigasket in einem definierten Abstand von etwa 250 µm gehalten werden. Die Gummieinlage hat eine rechteckige Aussparung. Diese Fläche stellt die eigentliche Flusskammer dar. Die genaue Größe der Kammer ist wichtig für die Berechnung des Scherstress und der Flussraten.

Der obere Teil der Kammer wird gebildet von einem Plastikzylinder, der über zwei Pins mit der Gummiunterlage verbunden wird. An dem oberen Teil der Kammer finden sich drei Anschlüsse für Plastikschräuche:

- An den beiden sich gegenüberliegenden Schläuchen wird die zu untersuchende Flüssigkeit in die Kammer eingespritzt bzw. aus der Kammer entfernt.
- Der dritte Anschluss ist für die Vakuumpumpe bestimmt.

Die untere Seite der Kammer wird von dem zu beschichteten Liganden gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Petrischalen mit Fibrinogen in einer Konzentration von 20 µg/µl als Ligand beschichtet. Für jeden neuen

Versuchsansatz wurde eine neue Petrischale verwendet. Diese stellt die eigentliche Beobachtungsfläche für den Versuch dar. Nachdem die Gummieinlage mit etwas Fett auf den oberen Teil der Kammer angebracht wurde, wurde die Kammer in eine mit Fibrinogen beschichtete Petrischale hineingegeben. Gleichzeitig wurden alle Schläuche luftleer mit PBS gefüllt und das System an die Vakuumpumpe angeschlossen. Durch das gleichzeitige Anlegen eines Vakuums wurde die ganze Kammer abgedichtet.

Der Abflussschlauch wurde mit der in die Harvardpumpe eingespannte 50 ml Perfusorspritze verbunden und der Einlaufschlauch wurde in ein flüssigkeitgefülltes Falcon (Zellsuspension oder Hams12 ohne FCS) eingeführt. Damit wurde gewährleistet, dass während des Versuches ein geschlossenes System aufrechterhalten werden konnte.

Mit den unten aufgeführten Größen ließ sich bestimmen, mit welcher Geschwindigkeit die Flüssigkeit in die Flusskammer eingespritzt, bzw. welchem Scherstress die Zellen ausgesetzt werden sollten.

Der Scherstress wird wie folgt berechnet:

Gasket C Dicke: 0,0254 cm

 Weite: 0,5 cm

τ_w = Scherstress

γ = Scherrate

μ = Viskosität

a = Gasketdicke

b = Gasketweite

$$Q = \text{Flussrate} \quad \tau_w = \frac{6\mu Q}{a^2 b}$$

Zu untersuchende Zellen: CHO Zellen (unbehandelte Zellen)
 α VDel β_3 T562N
 α V β_3 T562N
 α VAA β_3 T562N Zellen.
Konzentration: $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in PBS (oder
HAMs12 ohne FCS)

Benötigt wurden ca. 5-10 ml Zellsuspension pro Zelllinie.

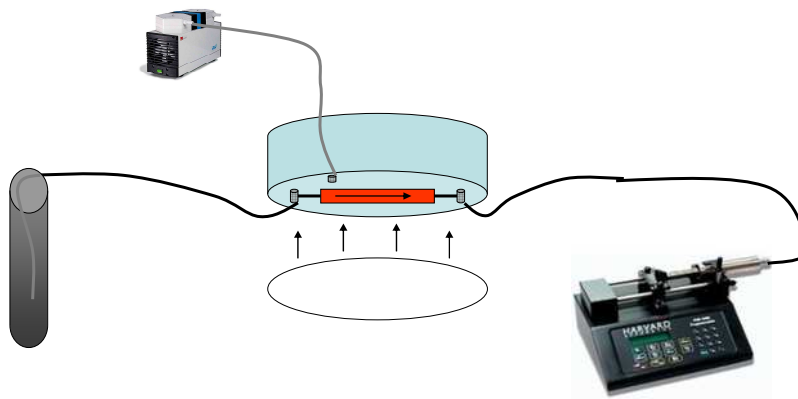


Abbildung 12, Schematischer Aufbau der Flowchamber, I.Ahrens, 2005

Versuchsaufbau nach Zusammensetzen der Flow chamber:

Nachdem die Kammer aufgebaut wurde, wurden alle Schläuche luftleer mit PBS gefüllt. Durch Anschluss einer CCD Kamera an das Mikroskop lassen sich die Bilder der Flusskammer digitalisieren und direkt auf den Computer übertragen. Die Zellsuspension wurde unter Videobeobachtung injiziert (mittels eines Plastikschauches wird die Zellsuspension in die Kammer hinein gepumpt) und ein repräsentativer Bildausschnitt gewählt. Anschließend wurde den Zellen 5 Minuten Zeit zum Interagieren mit der Matrix gegeben.

Dann wurde die Harvardspritzenpumpe 1 Minute auf 0,16129 ml/min (venöser Fluss), dann 3 Minuten lang auf 4,8387 ml/min (arterieller Fluss) und anschließend auf 6,4 ml/min für eine Minute eingestellt. Durch diese

Versuchsanordnung wurde der physiologische Scherstress nachgeahmt und die Zellen, die auf Fibrinogen adhären waren, wurden mit der definierten Flussrate über die ligandenbeschichtete Oberfläche gezogen. Während des ganzen Versuches wurde die Kammer gefilmt, wobei es für meine Versuchsanordnung wichtig war, fünf Minuten lang den gleichen Kammerausschnitt zu beobachten, d.h. die Perspektive während des laufenden Versuches nicht zu ändern. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Zahl der Zellen im zu untersuchenden Ausschnitt genau gezählt werden konnte.

Die Flussrate, die an der Harvardpumpe einprogrammiert wurde:

$$15 \text{ dynes/cm}^2 = \frac{6 \cdot (0,01) \cdot Q}{0,0254^2 \cdot 0,5} = 186 \cdot Q, \quad Q = 15/186 = 0,08064 \text{ ml/sec} = 4,8387 \text{ ml/min}$$

$$2 \text{ dynes/cm}^2 = \frac{6 \cdot (0,01) \cdot Q}{0,0254^2 \cdot 0,5} = 186 \cdot Q, \quad Q = 2/186 = 0,010752 \text{ ml/sec} = 0,64516 \text{ ml/min}$$

$$1 \text{ dynes/cm}^2 = \frac{6 \cdot (0,01) \cdot Q}{0,0254^2 \cdot 0,5} = 186 \cdot Q, \quad Q = 1/186 = 0,005376 \text{ ml/sec} = 0,32268 \text{ ml/min}$$

$$0,5 \text{ dynes/cm}^2 = \frac{6 \cdot (0,01) \cdot Q}{0,0254^2 \cdot 0,5} = 186 \cdot Q, \quad Q = 0,5/186 = 0,00269 \text{ ml/sec} = 0,16129 \text{ ml/min}$$

2.2.3 Zelladhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen:

Benötigte Materialien:

96 Wellplatten	NUNC, #167008
Fibrinogen	Fibrinogen FIB2, Enzyme Research Laboratories, South Bend , IN, USA, gelöst in PBS, Konzentration 20 µg/ml
1% BSA	Albumin bovine fraction V, Serva Electrophoresis, Heidelberg, #18518
HAMsF12	Gibco, Invitrogen
Triton X-100	Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany, #61K01741
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Germany, # TA393739909
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany, Art.Nr.T197.1

96 Wellplatten wurden am Vortag mit Fibrinogen in einer Konzentration von 20 µg/ml mit 50 µl pro Well beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand der 96 Wellplatten wurde verworfen und pro Well mit 100 µl 1% BSA/PBS 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die 96 Wellplatten 3 Mal mit 100 µl PBS gewaschen. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in HAMs F12 (ohne FCS) eingestellt. Jeweils 50 µl Zellsuspension pro Well der 96er Platte wurden eingesetzt. Von jedem Zelltyp wurden Ansätze in drei gleiche Wells (Triplet) gemacht, die für 15 Minuten bei 37°C im Inkubator adhäreren konnten.

In der Zwischenzeit wurde das Phosphatasesubstrat angesetzt: Pro Platte wurden 50 mg Phosphatasesubstrat (Sigma 104) in 15 ml Permeabilitätspuffer gelöst.

Permeabilitätspuffer setzte sich aus:

0,5 ml Triton X-100

4,2 g Natriumacetat

499,5 ml dH₂O zusammen.

Nach der Inkubation der Zellen wurde die Platte entleert und mindestens 6 Mal mit 100 µl PBS pro Well gewaschen. Das Phosphatasesubstrat wurde zugegeben und im Inkubator bei 37°C für mindestens 4 h inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 50 µl NaOH abgestoppt. Die gesamte Platte wurde bei 405 nm im Spektrometer gemessen.

2.2.4 Immunfluoreszenz von adhärenenten Zellen

Benötigte Materialien:

Deckgläser, rund, Durchmesser 12 mm, Stärke 1	R.Langenbrick, Teningen, ISO 8037/1
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca and Mg
Cellfix	BD Biosciences, Belgium, # 0503810005
Triton-x100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland # 61K01741
Primärantikörper LM 609	Chemicon International, #25050597
Sekundärantikörper (Anti Mouse FITC)	Jackson Immuno Research, #43961
Phalloidin-TRITC	Sigma -Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA94010

Die runden Deckgläschen wurden über Nacht in einer 24-well Platte mit 100 µl Fibrinogen in einer Konzentration von 20 µg/ml beschichtet. Danach wurden beschichtete Deckgläschen 1 h mit 1%igem BSA bei 37°C blockiert. Im Anschluss wurden sie 3 Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Es schloss sich eine 60 minutige Adhäsion der Zellen an. Danach wurden die Zellen mit 500 µl Cellfix 1%

Triton-x100 bei 4°C fixiert und für 15 Minuten permeabilisiert. Darauf folgend wurde 2 Mal mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden im darauf folgenden Schritt 30 Minuten lang bei RT im Dunkeln mit Phalloidin und Primärantikörper LM 609 50 µl/ well inkubiert. Eine 3 fache Waschung mit PBS schloss sich an. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte im Dunkeln bei RT 30 Minuten.

Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette einzeln entnommen und umgedreht auf einen Objektträger gelegt auf dem vorher ein Tropfen Vectashield aufgebracht wurde.

Die Bilder wurden mittels eines Immunfluoreszenzmikroskopes aufgenommen (Axioplansoftware). Zweikanalaufnahmen wurden gemacht (Rhodamin und FITC).

2.2.5 Immunpräzipitation

Abfolge der einzelnen Schritte in einem Protein-Blotting- Versuch:

1. Probenvorbereitung
2. Gelelektrophorese
3. Elektro-oder Dotblotting
4. Gesamtproteinfärbung
5. Nachweisreaktion
6. Visualisierung

2.2.5.1 SDS-PAGE

Mit Hilfe des SDS-PAGE lassen sich Proteine, nach Denaturierung durch SDS (Natriumdodecylsulfat) und Erhitzen bei 95 °C, nach ihrem Molekulargewicht auftrennen und auf dem Gel durch entsprechende Färbemethoden darstellen.

Je nach Bedarf kann die Acrylamidkonzentration zwischen 7,5% und 20% variieren, wobei im Netzwerk des Polyacrylamids große Moleküle stärker retardiert werden als kleine. Bei niedrigen Acrylamidkonzentrationen ist der molekulare Siebeffekt gering, womit eine Trennung aufgrund des Verhältnisses von Masse zu Ladung gegenüber einer größenabhängigen Trennung überwiegt. Mit zunehmendem Gehalt an Polyacrylamid werden kleinere Proteine stärker

aufgetrennt. Zusätzlich kann die Gelelektrophorese in nicht reduzierter und reduzierter Form durchgeführt werden. In letzterem Fall bewirkt die Zugabe von β -Merkaptoethanol eine Spaltung der Disulfid-Brücken, so dass eventuelle Untereinheiten eines Proteins darstellbar sind.

2.2.5.2 Western-Blot

Beim Protein-Blotting wird die gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteinmischung auf eine proteinbindende Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der Mischung spezifisch ist oder sein soll. Das Blotten der getrennten Proteine bietet dabei den Vorteil, dass die Membran als Trägermatrix viel einfacher zu handhaben ist als ein Gel und die Proteine auf der Oberfläche der Membran isoliert sind. Ursprünglich wurde die Methode dazu entwickelt, das Molekulargewicht eines Proteinantigens zu bestimmen oder die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem in einer Proteinmischung befindlichen Antigen zu überprüfen.

Der Transfer muss immer senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht.

Unmittelbar nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und wie folgt vorbereitet: 20 sec in Methanol, 2 min in Wasser, 5 min in Towbin-Puffer. Der Zusammenbau des Wet-Blots muss luftblasenfrei erfolgen und bestand aus folgenden Schichten: Schwammtuch – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Schwammtuch. Anschließend wurde dieses Sandwich so in die Halteschienen der mit Towbin-Puffer gefüllten Blot-Apparatur eingesetzt, dass die Membran zur Anode (+) und das Gel zur Kathode (-) zeigt. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 30 V durchgeführt.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$. Im Vergleich dazu liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm . Über das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz kann die Konzentration einer Probe bestimmt werden. Als Näherung kann angenommen werden, dass eine $\text{OD}_{280 \text{ nm}} = 1,0$ einer Proteinkonzentration von ca. $1,0 \text{ mg/ml}$ entspricht.

BCA-Protein Assay nach Lowry

Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurde eine arithmetische Verdünnungsreihe eines BSA-Standards angelegt. Jeweils $25 \mu\text{l}$ der Standards und der Proben unbekannter Konzentration wurden in Triplets in die Wells pipettiert. Hinzu addierte man $200 \mu\text{l}$ des kurz vorher angesetzten BCA-Protein-Reagenzes und inkubierte die Platte für 30 min bei 37°C . Anhand der BSA-Verdünnungen konnte dann eine Standardkurve erstellt werden, auf der die optische Dichte bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Aus dieser Kurve konnten die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

Die Protein-Konzentrations-Bestimmung mittels Photometrie erforderte keine speziellen Materialien.

BCA Protein-Assay

BCA Protein Assay Kit Pierce, Rockford, IL, USA, #23225

BSA-Standard-Lösungen arithmetische Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (SERVA, Heidelberg, Deutschland) in folgenden Konzentrationen: $1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50, 25 \mu\text{g/ml}$

2.2.5.4 Verwendete Materialien**Separating buffer 4x (500ml):**

90,9g Tris (1,5M)

(Sigma-Aldrich, Deutschland)

2g SDS (0,4%)

(GERBU Biotechnik, Gaiberg,
Deutschland, #1113)400 ml H₂O

pH 8,8 Einstellung mit HCl

Stocking puffer:**Für 500 ml** 30,3 g 0.5 M Tris

2 g 0,4 % SDS

pH 6,8 mit HCl

Reduzierender Probenpuffer 5x:

250 mM Tris (0,5 M), pH 6,8

(Sigma-Aldrich, Deutschland)

10% SDS

(GERBU Biotechnik, Gaiberg,
Deutschland, #1113)

0,5 % Bromophenolblau

(SIGMA-Aldrich, Deutschland,
#B 5525)

50% Glycerol

(SIGMA-Aldrich, Deutschland,
G5516)

500 mM DTT

(ROTH, Karlsruhe, Deutschland
#6908.1)**Lysispuffer :**

1%

NP40

500µl

2mM

Na₃VO₄

18,4 mg

2mM

PMSF

0,5 ml Stammlösung,

48 ml PBS

1 Tbl. Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, Missouri, USA # 8340
----------------------------------	--

Stammlsg.	34,8 mg in 1 ml Ethanol(entspricht 200 mM)
-----------	---

NT-Puffer:

170 ml NaCl	1M
50 ml Tris pH7,4	1M
2 ml NP 40	

Auffüllen mit Aqua dest auf 1 l.

Separating Gel (für 2 Gele) 7,5%:**0,75 mm**

Separating puffer 4x	3,5 ml
30 % Acrylamid	3,5 ml
dH ₂ O	7,0 ml
	82 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)/H ₂ O
	7,5 µl TEMED

Stacking Gel (für 2 Gele) 4% :

Stacking puffer 4x	4, 5 ml
30% Acrylamide	1,89 ml
dH ₂ O	1, 13 ml
	55 µl 10% APS
	7,5 µl TEMED

Elektrophoresepuffer 10x:

30 g 25 mM Tris

76,6 g 102 mM Glycin

10 g 1% SDS

Transferpuffer- Towbin- Puffer 10X für 1 l:

30 g 125 mM Tris

144 g 960 mM Glycin

2 ml 1% SDS

1X Puffer mit 1/10 Methanol

Kolloidgoldfärbung:

Colloidal Gold Total Protein Stain

Bio Rad Laboratories, # 170-6527

Supersignal West Pico Chemiluminescent

Pierce Chemical Company, Rockford,
USA, #34080

2.2.5.5 Immunpräzipitation mit anti-FAK nach 20 Minuten Adhäsion auf Fibrinogen

Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 eingestellt und auf einer 10 cm großen mit Fibrinogen beschichteten Petrischale 20 Minuten bei 37°C adhärirt. Der Überstand wurde separat entfernt und die Zellen wurden dann mit dem Zellschaber und je 2ml PBS geerntet.

Im nächsten Schritt wurden sowohl die Zellen als auch die Überstände 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden dann verworfen und die Pellets in 10 ml PBS (4°C) resuspendiert. Das Ganze wurde für weitere 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 2-mal wiederholt.

Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit jeweils 1 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorftube übertragen. Die Ansätze wurden bei 4°C für 40 Minuten lysiert. Anschließend wurden die tubes 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Die Proteine, die sich im Überstand befinden, wurden in frische Eppendorftubes übertragen.

Gleiche Proteinmenge von 0,5 mg/ml wurde mit 4 µg anti-FAK clone 4,47 versetzt und über Nacht in 2 ml Tubes im Überkopfschüttler auf Stufe 20 bei 4°C präzipitiert.

Am Ende des ersten Tages wurden die Polyacrylamid-Gele mit einem 7,5% Trenn- und 4% Sammelgel gegossen.

Am folgenden Tag wurden die magnetic Protein G beads mit 1%igem BSA 1 h bei RT geblockt. Danach mindestens 3 -mal mit jeweils 500 µl Lysis-Puffer gewaschen. Zum Waschen der beads wurde ein Magnet der Firma Dynal verwendet. Beim Pelletieren der beads mit dem Magneten zwischen den einzelnen Waschsschritten wurde darauf geachtet, dass alle beads vom Magneten an die Wand des Eppendorftubes gezogen worden waren.

Anschließend wurden die mit anti-FAK versetzten Zell-lysate zu den beads gegeben und 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler präzipitiert. Die bead-Zell-lysate wurden 4 Mal mit je 500 µl Lysis-puffer gewaschen. Anschließend in 70 µl Lysispuffer resuspendiert.

Die Portion, die für die Gele verwendet wurde, wurde mit 5x reduzierendem Probenpuffer versetzt und 10 Min bei 96°C inkubiert. Mit dem Magneten wurden die beads entfernt und die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Anschließend liefen die Gele bei 30 mA. Die Immobilon-P-Membran, die für den Transfer benutzt wurde, wurde für 5' mit Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte entweder über eine Stunde bei 100 V oder schonender im Kühlraum über die Nacht bei 30 V.

Die Membranen wurden am folgenden Tag 3- Mal mit NT-Puffer gewaschen dann die Proteinbanden irreversibel mit der Kolloid-Goldfärbung sichtbar gemacht und der ungebundene Farbstoff mit Aqua dest entfernt.

Dann wurden die Membranen für 1 h bei RT mit NT-Puffer und 2%BSA geblockt.

Anschließend erfolgte eine 3fache Waschung der Membran mit 10-15 ml NT-Puffer.

Eine Membran wurde mit Anti-FAKclone 4,47 (Mausmonoklonaler IgG1), in Konzentration 1:1000(1µg/ml) in NT-Puffer mit 0,5% BSA und 0,01 Thimerosal, die andere mit 4G10 (Mausmonoklonaler IgG_{2bK}) in der Konzentration 1:500(20 µg/ml) in NT-Puffer mit 0,5% BSA und 0,01 Thimerosal für 2 h inkubiert.

Anschließend wurde jeder Ansatz 3x für 10 Minuten mit NT-Puffer gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-mouse IgG HRP konjugiert), in der Konzentration 1:500, für eine Stunde bei RT.

Danach wurden die Membranen 3-mal mit NT-Puffer und 1 Mal mit Aqua dest gewaschen. Am Schluss wurden sie mit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate für 5 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die Exposition des Films für 1,5 und 3 Minuten sowie die Filmentwicklung in der Dunkelkammer.

3. Ergebnisse

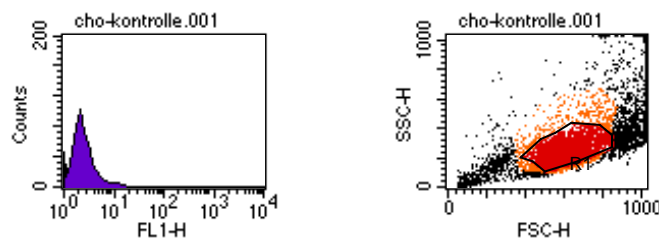
3.1 Etablierung stabil exprimierender Zellen

3.1.1 Expressionsüberprüfung und Zellsorten

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Expressionsprüfung im FACS Gerät vorgestellt. Unter 2.2.1 des Materialien- und Methodikteiles wurde Näheres zum FACSen erläutert. Mit Hilfe des FACS-Gerätes gelang es, Zellen mit aktiviertem von Zellen mit nicht aktiviertem Rezeptor zu unterscheiden. Wie unter 2.2.1.3 beschrieben, wurden die Zellen mit dem FITC gekoppelten AK LM 609 inkubiert. Nach der Inkubation ließen sich aktivierte Zellen detektieren, da der AK nach dem Schlüssel- Schloss Prinzip in das Oberflächenmerkmal passte. Anschließend wurden die durch die FACS- Kontrolle gewonnenen Klone mit einem speziellen FACS-Gerät (Zellsorter) in verschiedene Subpopulationen getrennt, deren Expression überprüft wurde, so dass wir am Schluss beinahe reine Klone erhielten.

3.1.1.1 CHO-K1 Negativkontrolle

CHO-K1 Zellen wurden in allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen als Negativkontrolle eingesetzt.



Bindung von FITC gekoppeltem AK LM-609

Abbildung 13, FACS-Ergebnis der CHO-K1 Zellen zur Negativkontrolle.

Die erste Abbildung stellt ein Histogramm dar, die zweite wird Dotplot genannt.

Histogramm: Hier wird die Häufigkeitsverteilung in einer Probe dargestellt. Bei der Analyse der CHO-K 1 Zellen wurden die Parameter so gewählt, dass die Zellen im Bereich zwischen 10^0 und 10^1 zu liegen kommen. Dies war wichtig, da dieser Bereich der Negativen Kontrolle vorbehalten war und alle weiteren Messungen eine identische Instrumenteneinstellung als Ausgangspunkt hatten. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen wurden mit der Negativkontrolle verglichen.

Dotplot: Hier werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen, wobei jede einzelne Zelle als ein Punkt dargestellt wird. Die zu suchende Zellpopulation kann mit einem Gate versehen werden. Nur diese Zellen werden in die Messung einbezogen.

3.1.1.2 Expressionskontrolle der $\alpha_V\beta_3$ T562N Klone

Es wurden insgesamt 100 Klone der $\alpha_V\beta_3$ T562N Zelllinie getestet. Exemplarisch wird die Expression von 28 Klonen dargestellt. Der Klon, dessen Expression am deutlichsten war, wurde für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt und in der Abb. 15 mit einem Pfeil markiert.

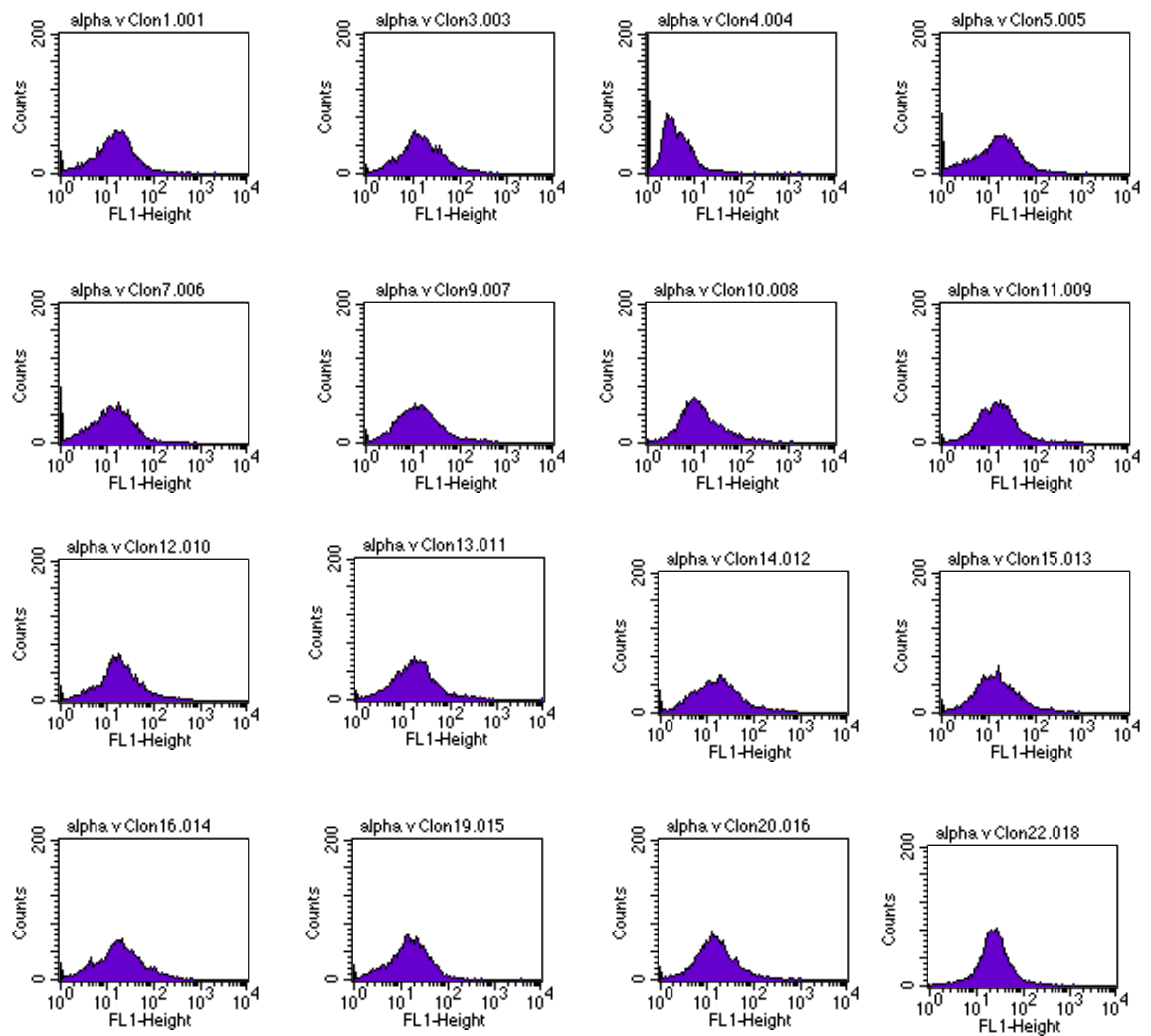
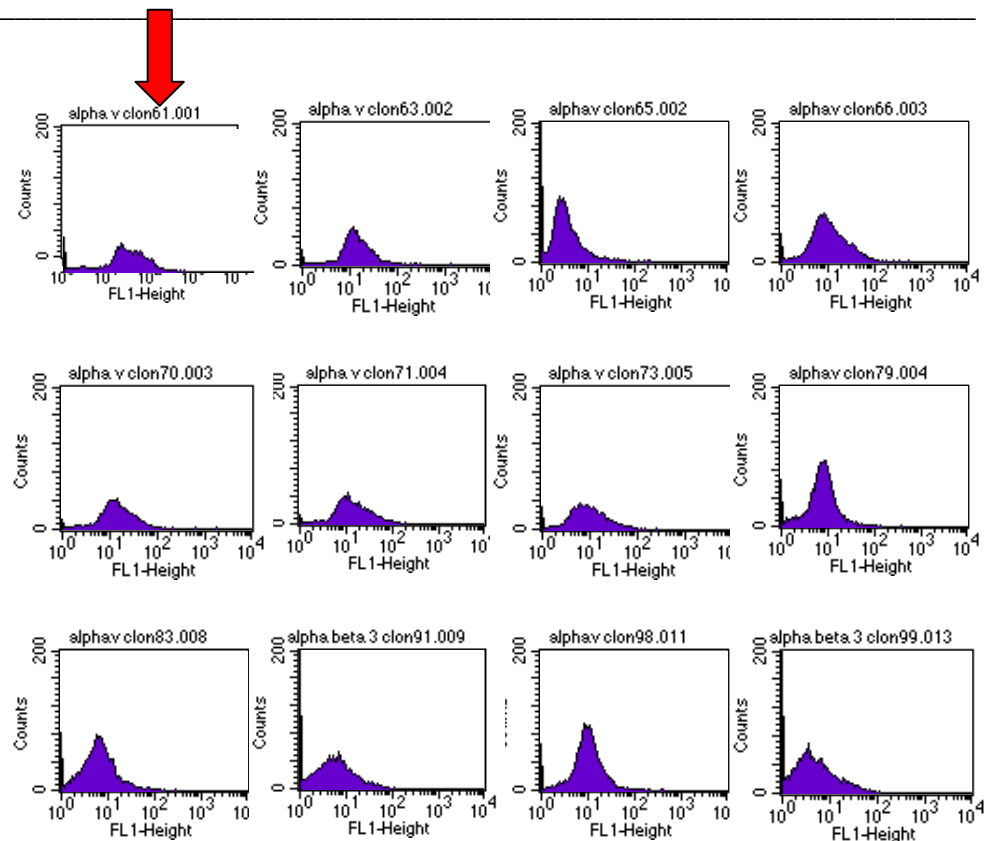
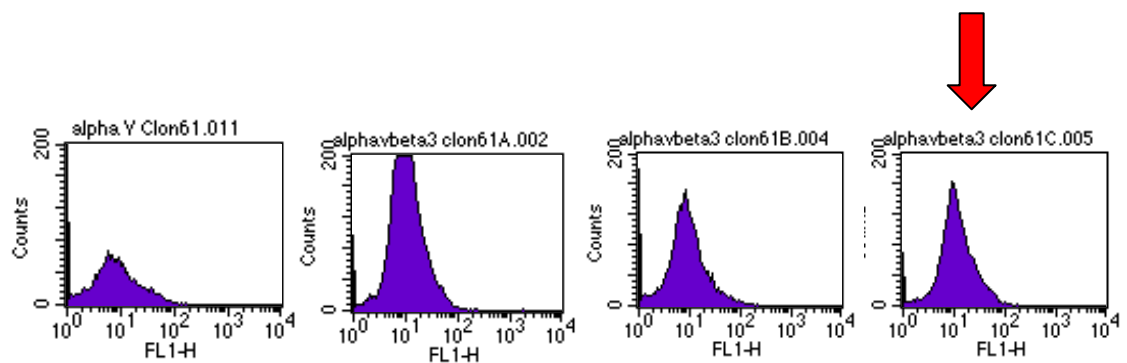


Abbildung 14, FACS- Ergebnisse der $\alpha_V\beta_3$ T562N Klone Teil I

Abbildung 15, FACS- Ergebnisse der $\alpha_v\beta_3$ T562N Klone Teil II

3.1.1.3 Sorten der $\alpha_v\beta_3$ T562N Klone

Der Klon 61, der im FACS die beste Expression zeigte, wurde im Zellsorter in drei Zellpopulationen getrennt, von denen die 3. Population das beste Ergebnis im FACS- Versuch (siehe 2.2.1.3) aufwies.

Abbildung 16, Ergebnisse des Zellsortens der $\alpha_v\beta_3$ T562N Klone

3.1.1.4 Expressionsprüfung der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N Klone

Es wurden etwa 100 Klone dieser Zelllinie auf ihre Expression geprüft. Der Klon 67 wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

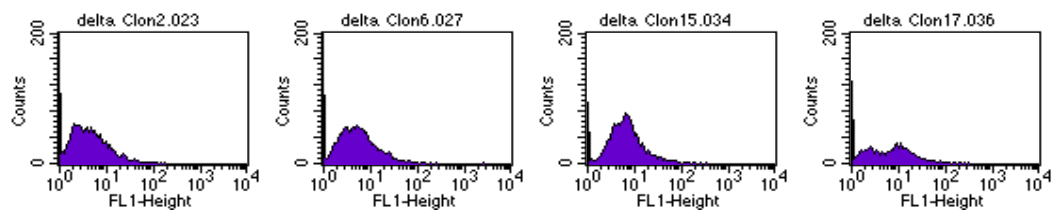
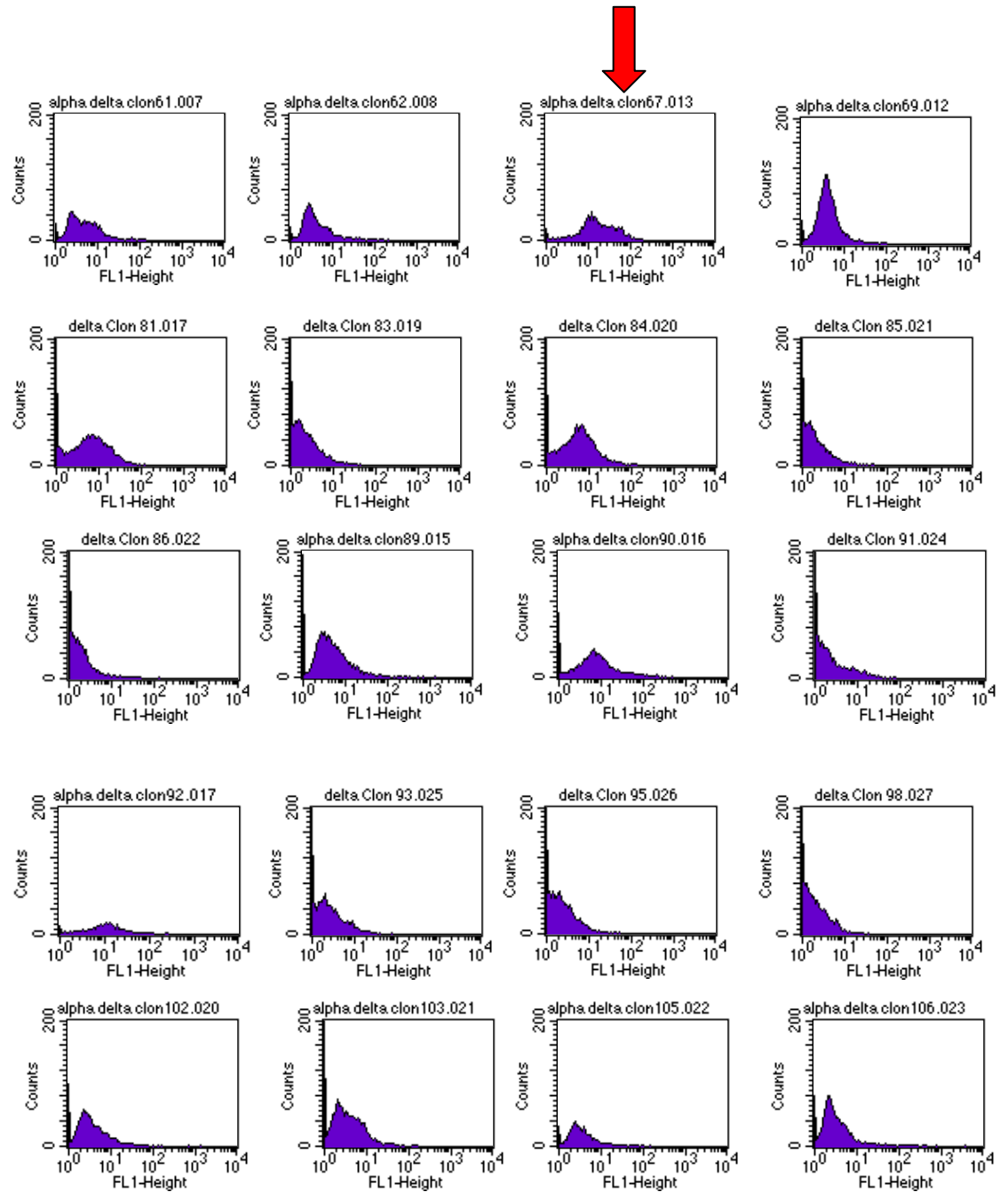


Abbildung 17, FACS-Ergebnisse der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N Klone Teil I

Abbildung 18, FACS-Ergebnisse der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N Klone Teil II

3.1.1.5 Sorten der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562 Klone

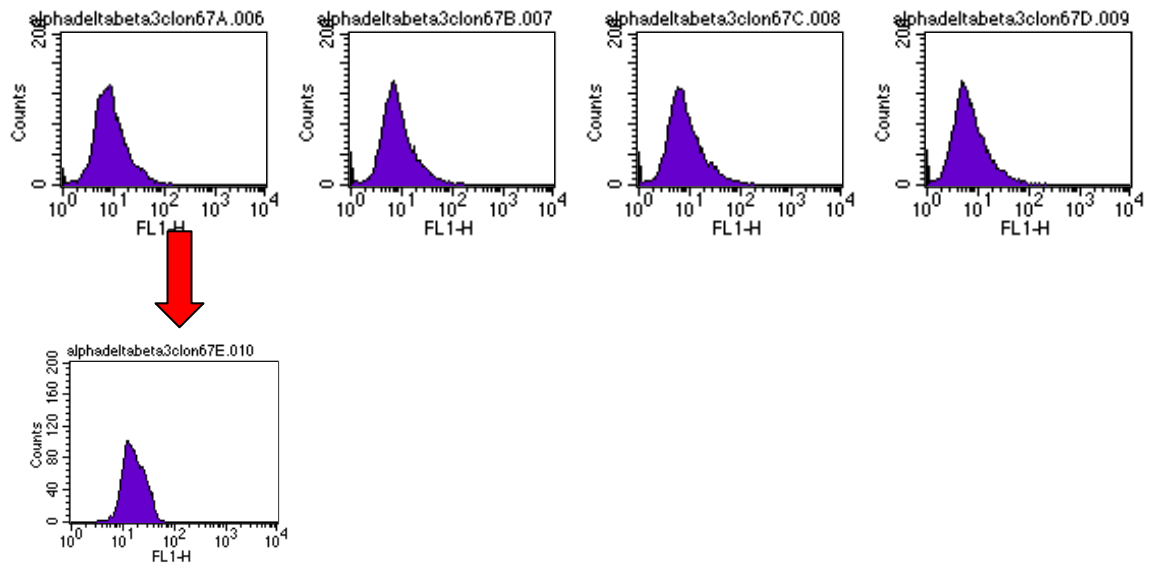


Abbildung 19, Ergebnisse des Zellsortens der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562 Klone

Bei Nummer 67 der $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N Klone wurden beim Zellsorten fünf verschiedene Zellpopulationen voneinander getrennt. Die Zellpopulation, die in weiteren FACS-Kontrollen das beste Ergebnis aufwies, wurde 67 E genannt und in weiteren Versuchen verwendet.

3.1.1.6 Expressionsüberprüfung der $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N Klone

Bei dieser Zelllinie war das Zellsorten nicht notwendig, da Klon 16 sehr gute Expressionsergebnisse hatte. Alle weiteren Versuche wurden mit Klon 16 vorgenommen.

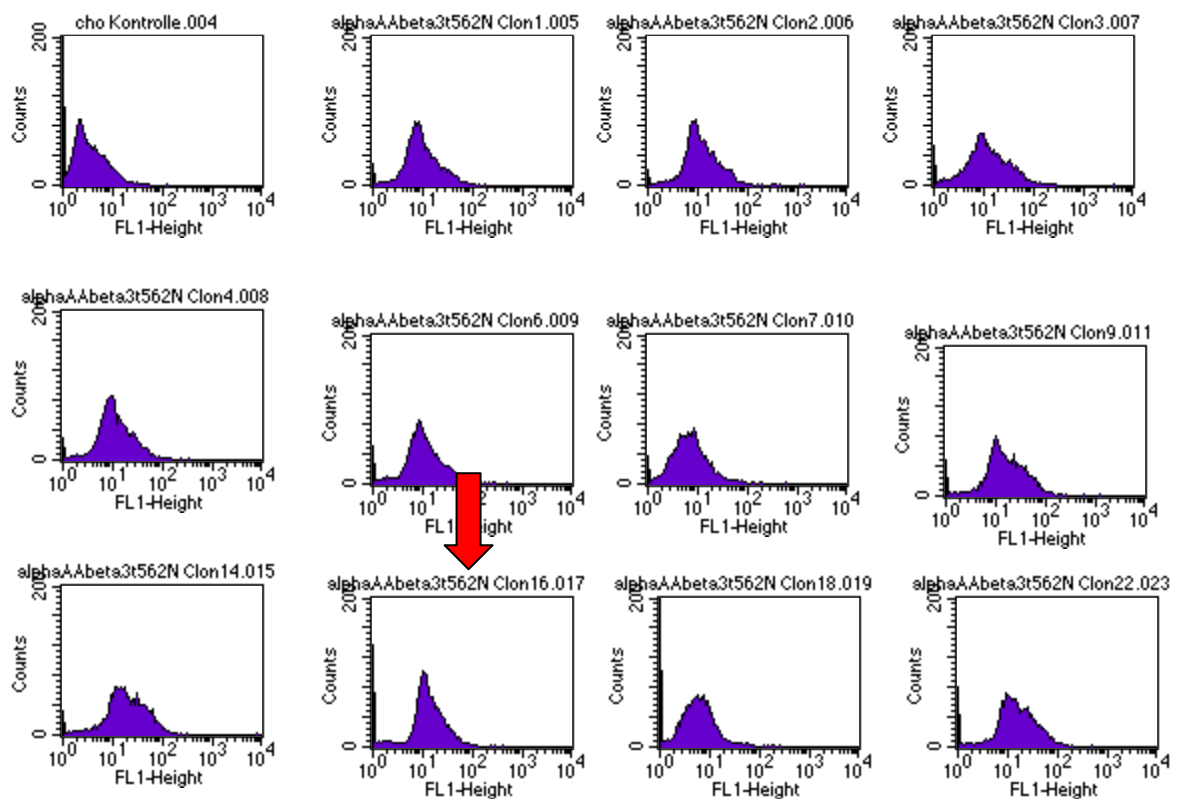


Abbildung 20, Ergebnisse der Expressionskontrolle der $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N Klone

3.1.2 Bestätigung der stabilen Transfektion

Zum Führen des Nachweises, dass die stabile Transfektion erfolgreich war, wurde die RNA aus allen in dieser Arbeit hergestellten Klonen extrahiert. Anschließend wurde, wie bereits unter 2.1.16 erklärt, eine RT-PCR durchgeführt. Die Produkte dieser Reaktion wurden durch die Firma Medigenomix sequenziert. Die stabile Transfektion erwies sich bei allen drei Zelltypen als erfolgreich. Stellvertretend für die drei Zelllinien wird in Abb. 13 der Nachweis der stabilen Transfektion anhand der $\alpha_v\beta_3$ T562N Mutation erbracht. An der Stelle 562 der β -Untereinheit wurde die Mutation von T562N ACG \rightarrow AAC, Threonin zu Asparagin vorgenommen. (siehe Pfeil)

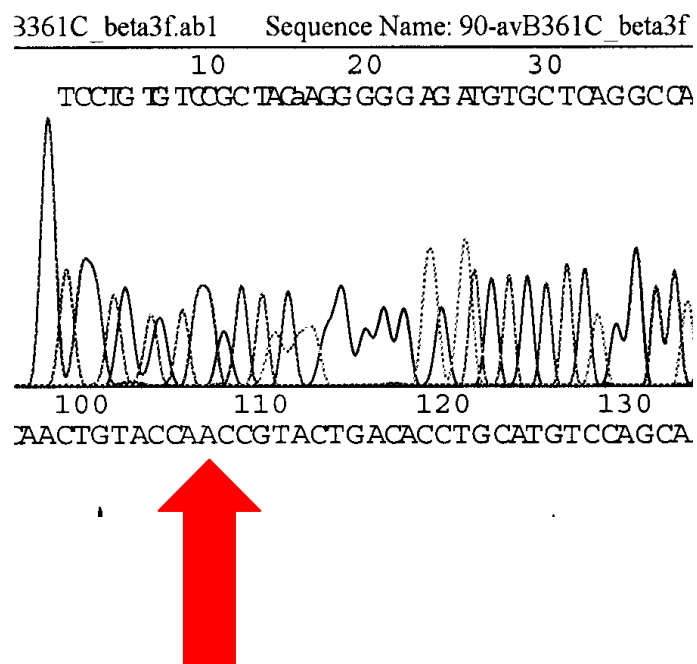
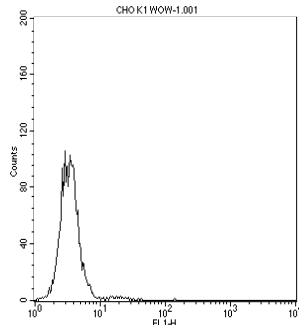
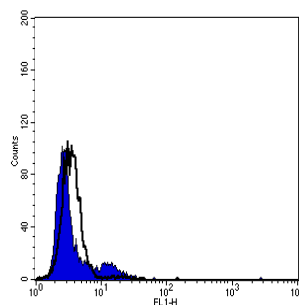
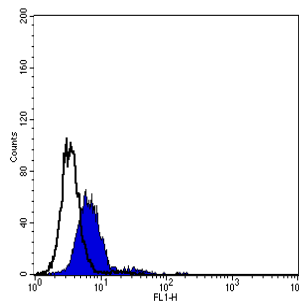
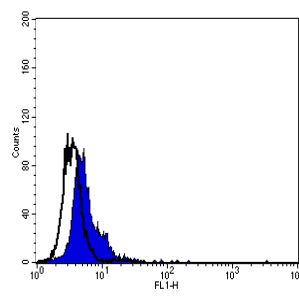
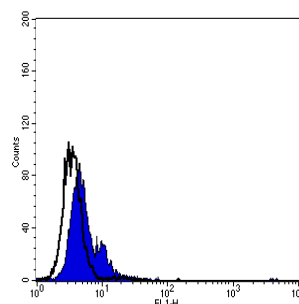


Abbildung 21, Sequenzausschnitt des $\alpha_v\beta_3$ T562N, Medigenomix 2005

3.2 Überprüfung des Aktivierungszustandes



CHO-K1

 $\alpha_v\beta_3$  $\alpha_v\beta_{3T562N}$  $\alpha_{VAA}\beta_{3T562N}$  $\alpha_{VDel}\beta_{3T562N}$

CHO-K1 Zellen dienen als Negativkontrolle mit der die Expression anderer Zelltypen verglichen wird. Der Antikörper WOW-1 wurde mit den Zellen inkubiert und anschließend die Expression gemessen.

Da WOW-1 nur an den aktivierten Vitronektinrezeptor bindet, ist aus den Histogrammen zu entnehmen, dass der Rezeptor der stabil transfizierten Zellen sich im aktivierten Zustand befindet. Sowohl $\alpha_{Del}\beta_3$ T562N als auch $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N exprimierende Zellen zeigten eine spontane Bindung des aktivations-spezifischen Antikörpers WOW-1.

Abbildung 22, FACS-Kontrolle mit WOW 1

3.3 Untersuchung der Rezeptorfunktion

3.3.1 Adhäsionsversuche

Die Ergebnisse des Adhäsionsversuches wurden in Form eines Diagramms dargestellt. Es wurden insgesamt drei Messungen vorgenommen. Auf der x-Achse wurden die verschiedenen Zelltypen und auf der y-Achse die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm dargestellt. Je stärker die Adhäsion der Zellen war, desto stärker war der Farbumschlag des chromogenen Substrates und somit die optische Dichte (OD).

Die Adhäsionsversuche zeigen, dass die drei β -Mutanten eine ähnliche Bindungsaffinität zu ihrem Substrat Fibrinogen haben. Der Wildtyp zeigt ein stärkeres Bindungsverhalten als die Mutanten, aber alle vier Zelltypen sind von der Adhäsion der CHO-K1 Zellen abzugrenzen, die ein maßgeblich schlechteres Bindungsergebnis vorzuweisen haben.

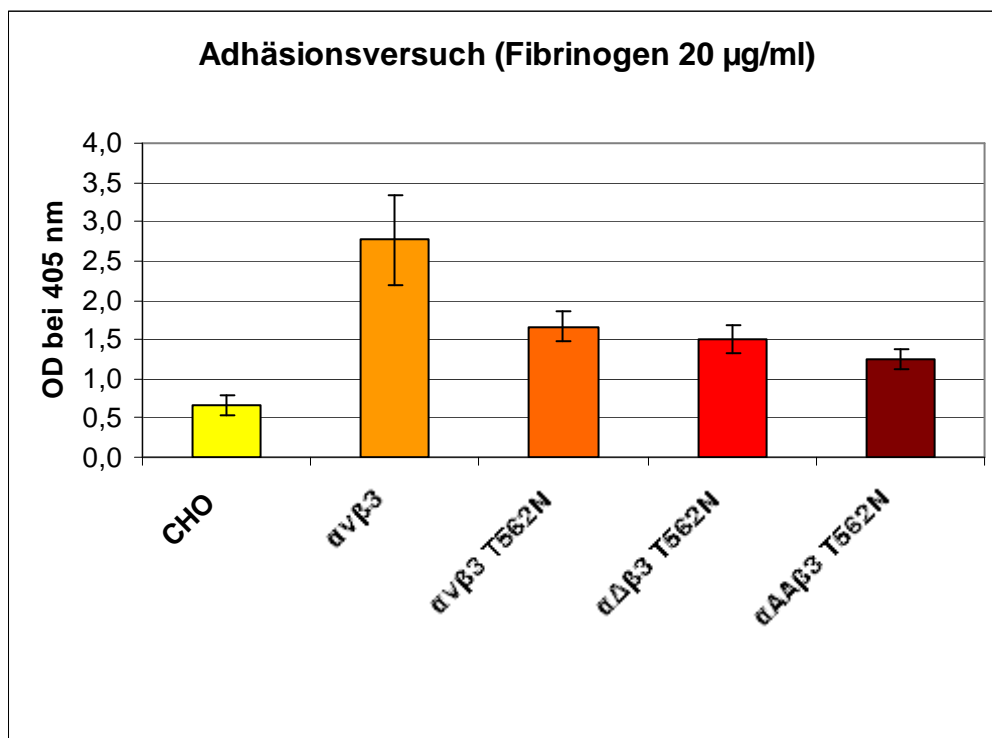


Abbildung 23, Extinktionsmessung, (n=3), Standardabweichung

Sowohl $\alpha_V\beta_3$ T562 N, $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 N als auch $\alpha_{AA}\beta_3$ T562 N exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine stärkere Adhäsionsaffinität. Die Adhäsion auf Fibrinogen war im Vergleich zu den Kontrollzellen um den Faktor 2 ($\alpha_V\beta_3$ T562 N und $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 N) bzw. 1,5 ($\alpha_{AA}\beta_3$ T562 N) höher.

Signifikanz des Adhäsionsversuches

CHOK-1-WT,	p = 0,031	
CHO-K1 AlphaVBeta3 T562N,	p = 0,006	<i>CHO-K1- andere Zelltypen: 0,6-3%, hoch signifikant</i>
CHO-K1- Alpha Del T562N,	p = 0,007	
CHO-K1- AA T562N,	p = 0,010	

3.3.2 Flowchamber

In der Flowchamber wurden die statischen Ergebnisse der Adhäsionsversuche durch eine weitere Ebene erweitert, um dort die Bindungsstärke der Zellen unter verschiedenen Scherraten zu prüfen. Drei Versuche wurden in die Auswertung integriert. Abb. 24 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen. Die Abszisse steht für die Flussgeschwindigkeit, die Ordinate gibt die Zellzahl wieder. In der Flowchamber hat sich gezeigt, dass die Negativkontrolle, die CHO-K1 Zellen, schon bei einem niedrigen Scherstress leicht abzuwaschen ist. Bereits bei der Erhöhung der Flussrate auf die venöse Flussgeschwindigkeit (0,5 dynes /cm²) lassen sich die meisten Zellen von ihrer Fibrinogenunterlage abwaschen. Im Gegensatz dazu steht das Adhäsionsverhalten des Wildtyps, welches sich sogar unter der arteriellen Flussgeschwindigkeit (20 dynes /cm²) nicht maßgeblich verändert. Ähnliches war auch bei den stabil transfizierten Zellen mit der β -Mutation T562N zu beobachten. Die in dieser Arbeit hergestellten stabilen Zelllinien zeigen in der Flowchamber, dass die Adhäsionsabnahme geringer ist als die der zu vergleichenden Negativkontrolle.

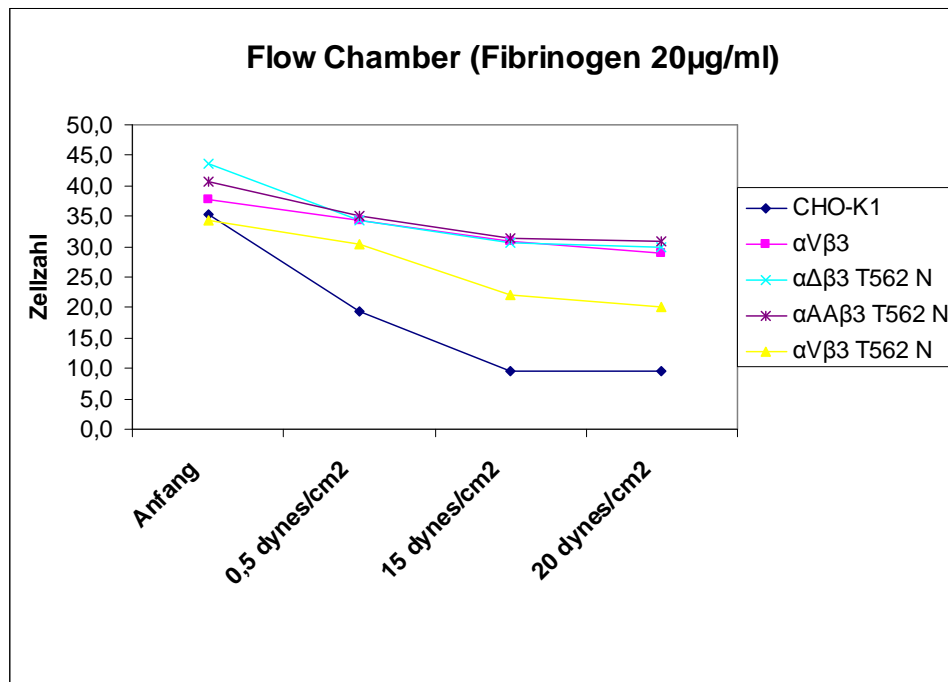


Abbildung 24, Flowchamberergebnisse, (n=3), Standardabweichung

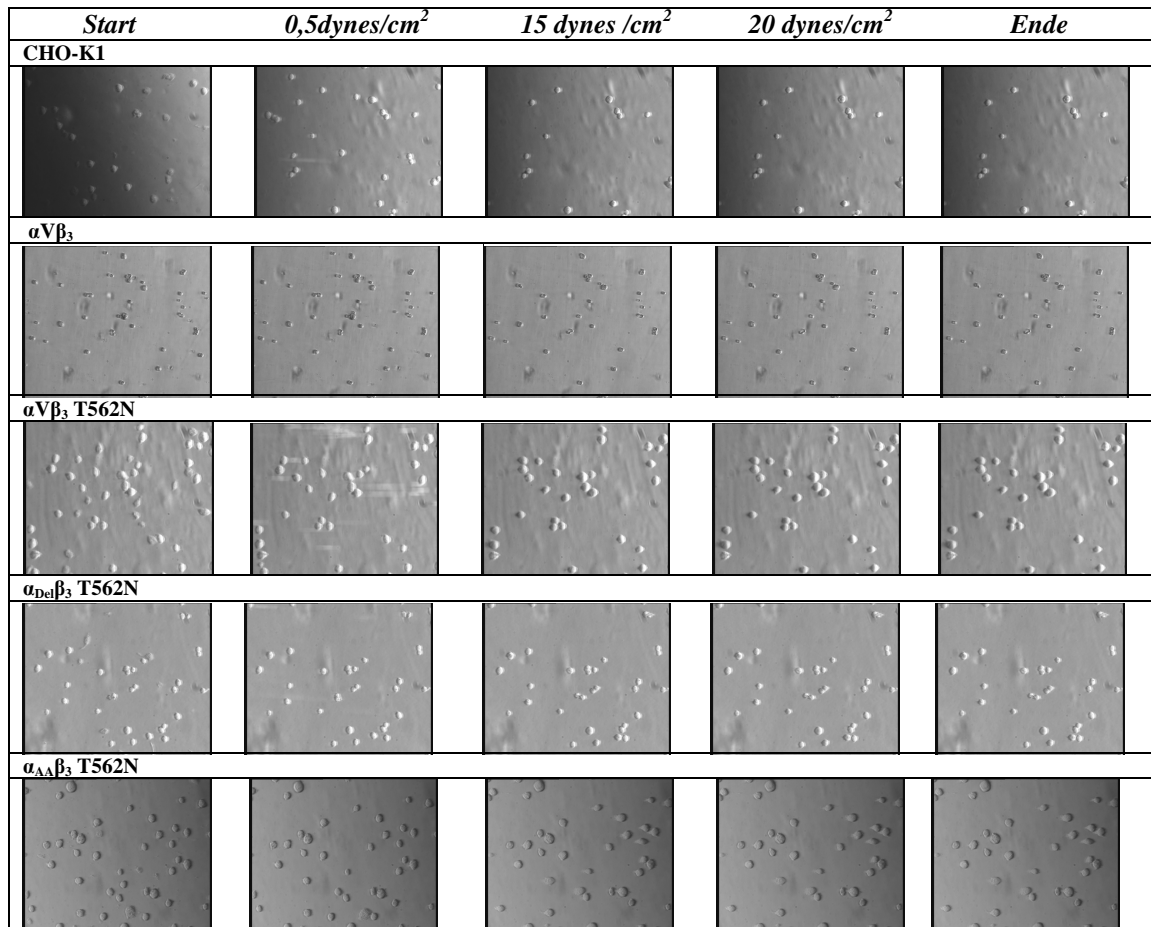


Abbildung 25, Repräsentative Bilder des Flowchamberversuches.

Von rechts nach links wurden 5 Bilder zu verschiedenen definierten Zeitpunkten und unter zunehmendem Scherstress im gleichen optischen Feld aufgenommen. Die Bilder wurden am Ende der angegebenen Zeit abgelichtet. Für 0,5 dynes nach 1 Minute, für 15 dynes nach 4 Minuten und für 20 dynes nach 1 Minute. CHO-K1 Zellen lassen sich schon bei 0,5 dynes abwaschen. Dem gegenüber steht das Bindungsverhalten des WT und der T562N Mutanten, die eine geringere Abnahme der Adhärenz unter kontinuierlichem Scherstress vorzuweisen haben. Bei Flussgeschwindigkeiten von bis zu 20 dynes waren noch 70% der $\alpha_V\beta_3$ T562 N, $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 N und $\alpha_{AA}\beta_3$ T562 N exprimierenden Zellen im Vergleich zu 20 % der Kontrollzellen.

Signifikanz des Flowchamberversuches:

Es wurden Mittelwerte der Negativkontrolle (CHO-K1) mit den Mittelwerten der zu untersuchenden Zellen $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$ T562 N, $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 N und $\alpha_{AA}\beta_3$ T562 N an definierten Zeitpunkten miteinander verglichen.

Anfang der Messung

CHO-K1-Wildtyp:	p= 0,726611456, n.s.
CHO-K1-AlphaVbeta3 T562N:	p= 0,867229867, n.s.
CHO-K1- AlphaDelbeta3 T562N:	p= 0,55030974, n.s.
CHO-K1- AA T562N :	p=0,42626045, n.s.

0,5 dynes/cm²

CHO-K1-Wildtyp:	p= 0,185422496, n.s.
CHO-K1-AlphaVbeta3 T562N	p= 0,293606183, n.s.
CHO-K1- AlphaDelbeta3 T562N	p= 0,1854225, n.s.
CHO-K1- AA T562N	p= 0,17766681, n.s.

15 dynes/cm²

CHO-K1-Wildtyp	p=0,018629195, signifikant
CHO-K1-AlphaVbeta3 T562N	p= 0,097519332 , schwach signifikant
CHO-K1- AlphaDelbeta3 T562N	p= 0,01694235, signifikant
CHO-K1- AA T562N	p= 0,0186292, signifikant

20 dynes/cm²

CHO-K1-Wildtyp	p=0,022103875, signifikant
CHO-K1-AlphaVbeta3 T562N	p= 0,164402199, n.s.
CHO-K1- AlphaDelbeta3 T562N	p=0,01998639 , signifikant
CHO-K1- AA T562N	p=0,02581306, signifikant

3.3.3 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden wie unter 2.2.4 vorbereitet und die Aufnahmen der Zellen wurden mittels eines Immunfluoreszenzmikroskopes gemacht. (Axioplansoftware). Die Aufgabe bestand darin, das Zytoskelett zu untersuchen und herauszufinden, ob Aktinstressfasern ausgebildet werden oder nicht. Die Zellen wurden mit dem Phalloidin-TRITC inkubiert. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit einer 100fachen Vergrößerung, mit Rhodamin gemacht.

Wie auf Abb. 26 zu sehen ist, zeigen die Rhodaminaufnahmen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Zellen mit der Mutation T562N der β_3 - Untereinheit Aktinstressfasern ausbilden. Im Gegensatz dazu gab es keinen Hinweis, dass die CHO-K1 Zellen dies auch tun.

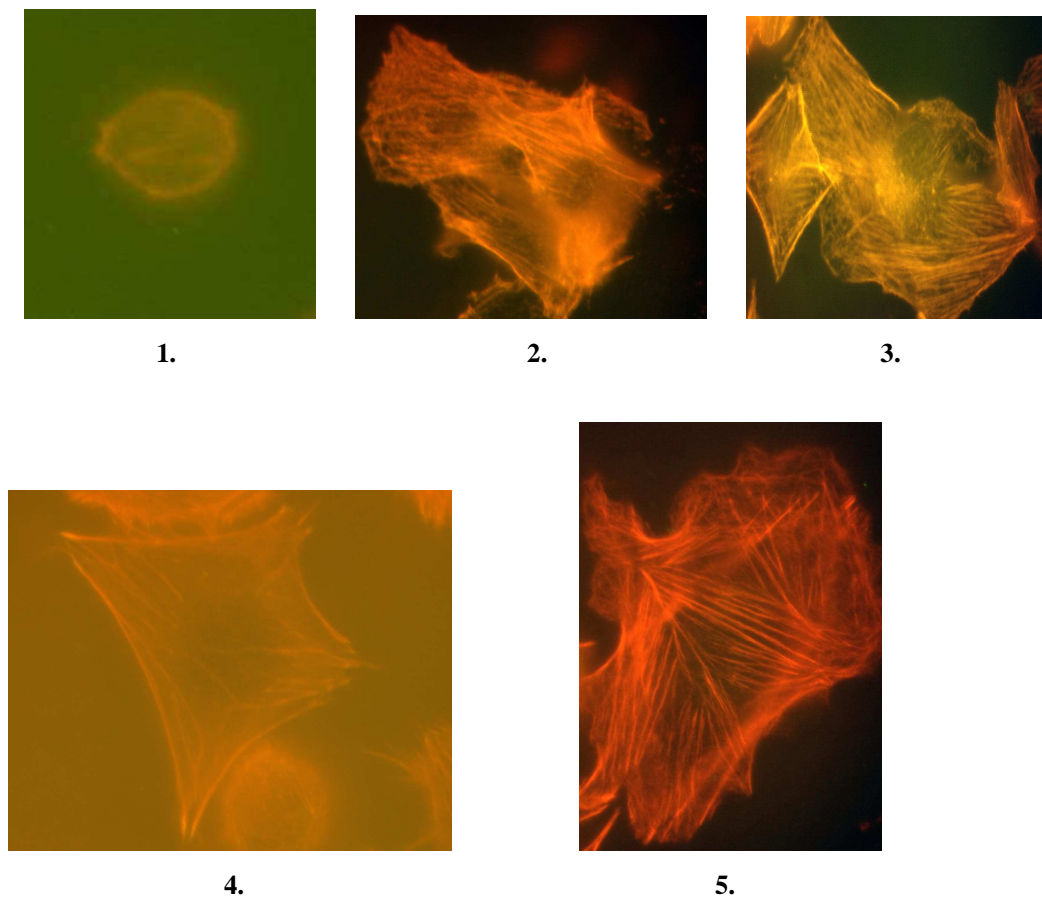


Abbildung 26, Immunfluoreszenzbilder, Rhodaminaufnahmen 1-5, 1 = CHO-K1, 2 = Wildtyp, 3 = AlphaVBeta3 T562N, 4 = AlphaDelBeta3 T562N, 5 = AlphaAABeta3 T562N

3.3.4 Immunpräzipitation

Exemplarisch wird folgend Abb. eines Versuches gezeigt. Die Filme, die wie unter 2.2.5.5 hergestellt wurden, wurden mittels einer Kamera digitalisiert und die optische Dichte der dargestellten Banden wurde mit einem speziellen Programm ausgewertet.

Aus der Auswertung ging hervor, dass bei den neu hergestellten Zelllinien der Anteil der phosphorylierten Tyrosinkinase pp125^{fak} an der Gesamtmenge der Tyrosinkinase FAK im Vergleich zu dem Wildtyp als ähnlich zu werten ist. Als Problem bei der Auswertung hat sich herausgestellt, dass die Negativkontrolle jedoch auch einen ziemlich hohen Anteil der phosphorylierten Tyrosinkinase pp125^{fak} an der Gesamtmenge der Tyrosinkinase FAK hat (unspezifische Phosphorylierung).

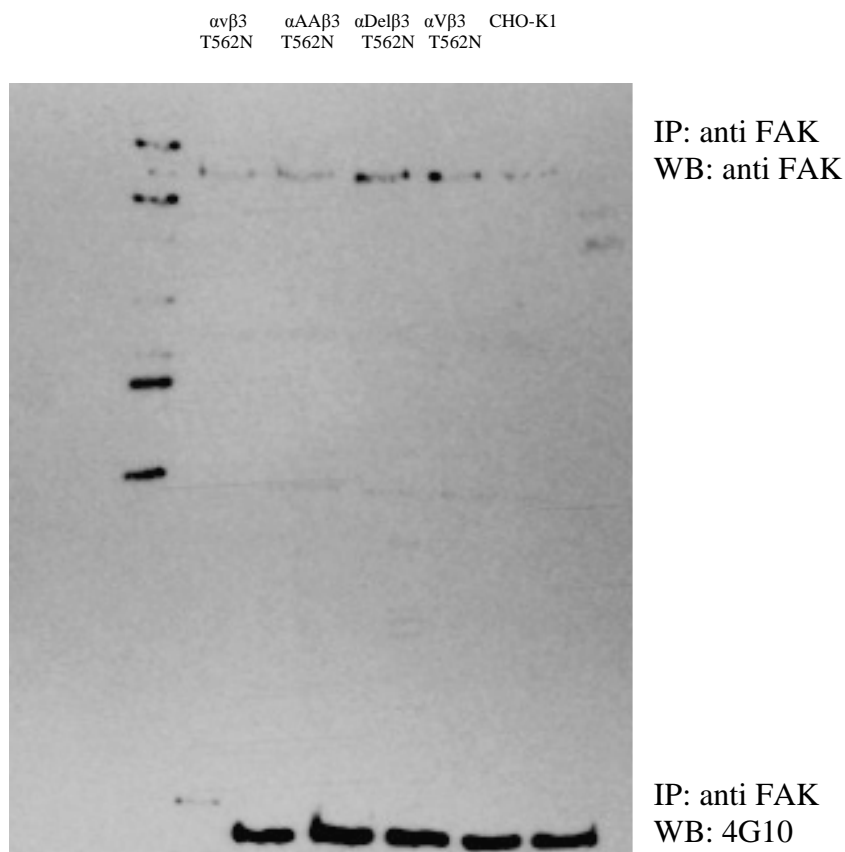


Abbildung 27, Total pp125^{FAK} versus phosphorylierte pp125^{FAK}

4. Diskussion

4.1 Diskussion der gentechnischen Ergebnisse

Vorab scheint es wichtig die Arbeit der Arbeitsgruppe Kashiwagi et al. zu erwähnen, welche sich zum ersten Mal mit der Mutation T562N des Vitronektinrezeptors beschäftigte. [9] Dieser Arbeitsgruppe gelang es nachzuweisen, dass die Mutation T652N innerhalb des intakten Vitronektinrezeptors zur ersten spontanen Aktivierung des Rezeptors führt. Auf dieser Erkenntnis basierend wurde die gleiche Mutation mit den bereits von unserer Arbeitsgruppe hergestellten Mutanten der α V-Untereinheit des Vitronektinrezeptors Del und AA zusammengebracht.

Durch Mutagenese-PCR-Reaktionen wurde die Mutation T562N in die β -Untereinheit des Vitronektinrezeptors eingebracht. Als Nachweis für die gelungene Mutation diente eine RNA-Aufreinigung sowie anschließende RT-PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte. Durch Transfektion wurden einzelne Klone mit stabilen Expressionslevels generiert. Die neu hergestellten Klone wurden regelmäßigen FACS-Kontrollen unterzogen und diese zeigten, dass das neue Zellmodell ähnliche Expressionlevels vorzuweisen hatte wie der Wildtyp.

Aus den Sequenzierungsergebnissen (siehe 3.1.2) lässt sich schlussfolgern, dass die stabile Transfektion gelungen ist und die Expression der Klone (siehe 3.1.1) zeigt, dass die Mutation T562N die Expression der neuen Mutanten nicht beeinflusst.

4.2. Diskussion der funktionellen Ergebnisse

Durch die stabile Transfektion ist es gelungen neue Zelllinien herzustellen, die sowohl eine Mutation in der α als auch in der β -Untereinheit tragen. Ziel dieser Arbeit war das Einbringen der β -Mutation T562N in den Vitronektinrezeptor, dessen α -Untereinheit in den bisherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe durch stabile Transfektion verändert worden ist. [10]

Die neu hergestellten Zelllinien wurden in fünf verschiedenen Versuchen geprüft. Zuerst bestätigte die FACS-Analyse, dass die Zellen im aktivierten Zustand sind. Anhand vier weiterer Versuche ließ sich die anfangs gestellte Vermutung, dass die

Mutation T562N der β -Untereinheit die Aktivierung des zuvor durch α -Mutationen inaktivierten Vitronektinrezeptors als Folge hat, untermauern. Die Forschungsgruppe P. Legendre et al. hat sich in ihrem Paper“ CHO Cells expressing the high affinity α Ib β 3 T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear“ mit einer ähnlichen Thematik beschäftigt, so dass wir unsere Beobachtungen mit den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe vergleichen können. [27] Die Hypothese von P. Legendre et al., dass die rezeptorvermittelte Adhäsion des Fibrinogenrezeptors durch den ansteigenden Scherstress beeinflusst werden kann, wurde anhand statischer und dynamischer Adhäsionsprüfungen, sowie mit Hilfe der Immunfluoreszenz, bestätigt. Obwohl wir mit dem Vitronektin- und nicht mit dem Fibrinogenrezeptor gearbeitet haben, ist der Vergleich mit der oben erwähnten Veröffentlichung interessant, denn beide Integrine gehören, wie bereits schon in der Einleitung erklärt zu der Familie der β_3 -Integrine und von der Mutation T562N ist bekannt, dass sie beide Rezeptoren aktiviert. [9]

4.2.1 Adhäsionsversuche als statische Prüfung

Diese Versuchsanordnungen dienten der Prüfung der Bindung, d.h., der Darstellung wie die Bindung des nativen versus des veränderten Vitronektinrezeptors auf der Fibrinogenmatrize ist. Anhand der durchgeführten Messungen ließ sich beobachten, dass die in dieser Doktorarbeit hergestellten stabilen Zelllinien besser adhärieren als die Negativkontrolle (CHO-K1 Zellen). Die Bindung der neuen Mutanten ist in etwa zu vergleichen mit der des Vitronektinwildtyps. Nun stellt sich die Frage, warum die durch die Mutation T562N veränderten Zellen ähnliche Adhärenz vorzuweisen haben wie der $\alpha_v\beta_3$ Wildtyp?

Als potentielle Deutungsmuster würden sich einerseits die veränderte Konformation des interzellulären Zytoskeletts durch die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Rezeptors, und die Verankerung mit dem Zytoskelett andererseits anbieten.

Verglichen mit den Ergebnissen der P. Legendre Arbeitsgruppe, die eine stärkere Interaktion zwischen dem durch die Mutation T562N modifizierten

Fibrinogenrezeptor und seinem Liganden Fibrinogen als zwischen dem WT und Fibrinogen festgestellt hat, lässt sich schlussfolgern, dass in unserer Versuchsanordnung die Mutanten nur eine Aktivierungstendenz gezeigt haben, denn die Interaktion des WT ist stärker als die der Mutanten, aber unterscheidet sich deutlich von der Negativkontrolle.

4.2.2 Flowchamber als dynamische Prüfung

Die neu gewonnenen Beobachtungen aus dem statischen Teil der Versuche wurden in der Flowchamber weiter verfolgt. Uns interessierte die Frage, wie sich die stabil transfizierten Zellen mit den veränderten Rezeptoren in einem dynamischen Umfeld verhalten werden.

Das Besondere an den Flowchamber Versuchen ist, dass in vitro nahezu physiologische Bedingungen nachgeahmt werden können und so das Verhalten der zu untersuchenden Rezeptoren unter verschiedenen Scherraten untersucht werden konnte, die durchaus mit den physiologischen zu vergleichen sind.

Die Ergebnisse der dynamischen Untersuchungen unterstützen die Aussage der Adhäsionsversuche: die veränderten Zellen zeigten auch in der Flowchamber ein stärkeres Bindungsverhalten als die CHO-K1 Zellen. Die Mutanten hatten eine vergleichbare Bindungsaffinität wie der native Wildtyp. Dies spricht für eine intakte Verankerung mit dem Zytoskelett. Die bisherige Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass die α -Mutanten, deren GFFKR Region verändert worden war, sei es durch die Deletion der ganzen Region oder durch die Mutation FF zu AA, durch die die zwei wichtigen Phenylalanine ausgetauscht worden sind, in der Flowchamber ein anderes Bindungsverhalten hatten. Vergleicht man aktuelle Ergebnisse mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, so fällt auf, dass die Mutation T562N der β_3 -Untereinheit in der Kombination mit den Mutanten der α -Untereinheit (Del, AA) zu einer Reaktivierung des Rezeptors führen muss, da das Bindungsverhalten sich im Sinne einer Aktivierung verändert. Die statistische Auswertung des Versuches zeigt anfangs keine Signifikanz, denn die Zellzahl ist am Anfang des Versuches als etwa gleich anzusehen. Mit der Zunahme der Flussgeschwindigkeit und unterschiedlich ausgeprägter Abnahme

der Zellzahl ändert sich die Tendenz. Durch den direkten Vergleich zwischen der statischen und der dynamischen Adhäsion zeichnet sich eine Zunahme der Adhäsion ab. Die Zellen, die die Mutation T562N in sich tragen zeigen eine stärkere Bindungskraft unter kontinuierlichem Scherstress als bei der statischen Versuchsanordnung. Es sieht aus als ob der von außen ausgeübte Stress die Zellen in ihrer Neigung zur Adhäsion bestärkt. Im Paper „Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cell expressing the Pro33 isoform of integrin β_3 “ von K. Vinod Vijayan et al. wird ebenfalls von der Zunahme der Bindungsfähigkeit unter kontinuierlichem Scherstress im Vergleich zu der statischen Adhäsionsprüfung berichtet. [12]

Unser Versuchsaufbau unterscheidet sich deutlich von dem der Arbeitsgruppe P. Legendre et al.. [27] Wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, haben wir die Zellen auf der Fibrinogenmatrize 5 min adhären lassen und dann unterschiedlichen, definierten Scherstressraten ausgesetzt. P. Legendre und sein Team gehen von einer längeren Adhäsionszeit aus: 12 Minuten. Danach werden die Zellen für 2 h mit IMDM gespült und die Scherströmung verdoppelt sich alle 10 Minuten bis die maximale Flussgeschwindigkeit erreicht worden ist. Der Effekt, der in diesem Versuch beobachtet werden konnte, dass die Adhäsion der Zellen, zuerst unter zunehmendem Stress abnimmt, aber sich dann durch den Scherstress eine Zunahme der Bindungsfähigkeit sowie Zellspreading abzeichnet, war in unserer Versuchsanordnung nicht zu beobachten, da wir das Verhalten der stabil transfizierten Zellen nicht länger als 10 Minuten verfolgt haben. Eine weitere Beobachtung von P. Legendre et al. scheint sehr wichtig zu sein: Diese Arbeitsgruppe stellte keinen Unterschied zwischen Aktinausbildung bei statischen und dynamischen Aufnahmen und folgerte daraus, dass die Zytoskelettorganisation und die Aktinpolymerisation durch den kontinuierlichen Scherstress nicht gestört werde. Die hier als Vergleich angeführte Arbeit wird unserer Arbeitsgruppe als Denkanstoß zur einen weiteren Entwicklung unseres Forschungsgegenstandes dienen können.

4.2.3 Immunfluoreszenz

Anhand der Immunfluoreszenz ließ sich nachweisen, dass durch das Einbringen der veränderten β -Untereinheit in den durch die mutierte α -Untereinheit modifizierten Vitronektinrezeptor eine Veränderung des Zytoskeletts eintrat. Diese Zytoskelettveränderung ist deutlich sichtbar, da die in dieser Arbeit beschriebenen stabilen Zellen Aktinstressfasern ausbilden (morphologisch intaktes Zytoskelett). [29] Unter 3.3.3 ist zu sehen, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den stabil transfizierten Zellen ($\alpha_V\beta_3$ T562N, $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 und $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N) gibt. Im direkten Vergleich mit den CHO-K1 Zellen ist hervorzuheben, dass diese keine Stressfasern ausbilden. Das gleiche Ergebnis zeichnete sich bei den transfizierten Zellen ab, in die α -Mutationen (Del, AA) eingebracht wurden. [10]

Wie die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, verursachen diese Mutationen der α - Untereinheit eine Deaktivierung des Vitronektinrezeptors.

4.2.4 Immunpräzipitation

Das Outside-in Signaling der Integrine führt zu Veränderungen des Zytoskeletts, die für die Zelladhäsion und auch für die Migration der Zellen notwendig sind. Ein Schritt in dieser Aktivierungskaskade ist die Phosphorylierung der Tyrosinkinase pp125^{fak} nach der Adhäsion auf Fibrinogen (20 μ g/ml). [10]

Die GFFKR-Region der α -Untereinheit und vor allem die zwei Phenylalanine sind an der Aktivierung der Integrine beteiligt. Die stabil transfizierten Zellen, deren GFFKR Region der α -Untereinheit entweder deletiert oder durch die Mutation FF to AA verändert worden ist, haben im Immunpräzipitationsversuch einen geringen Anteil der phosphorylierten Tyrosinkinase pp125^{fak} an der FAK, ein Beweis dafür, dass diese Integrine durch die Mutation der α -Untereinheit inaktiviert worden sind.

In dieser Arbeit wurden die inaktivierten α -Untereinheiten [10] des Vitronektinrezeptors mit der mutierten β -Untereinheit T562N zusammen gebracht worauf hin sich der Anteil der phosphorylierten Tyrosinkinase pp125^{fak} an der FAK erhöht. Dies spricht für eine Reaktivierung des Rezeptors.

Kashiwagi et al. haben in ihrer Veröffentlichung „A Mutation in the extracellular Cysteine Rich Repeat Region of the β_3 Subunit activates Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_V\beta_3$ “, einen ähnlichen Versuchsaufbau gemacht, wobei sie mit löslichem Fibrinogen gearbeitet haben. Ihr Fazit war, dass die Mutation T562N des Vitronektinrezeptors nicht ausreichend suffizient war, um ein Rezeptorclustering zu triggern. Unsere Beobachtungen würden tendenziell dafür sprechen, dass der mutierte Rezeptor starke Neigung zur Phosphorylierung hat. Als problematisch zu betrachten ist die Tatsache, dass die CHO-K1 Zellen in unserem Versuch gewisse Phosphorylisierungstendenzen zeigten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Adhäsionszeit von 20 Minuten unspezifische FAK-Phosphorylierung verursacht werden könnte. Möglicherweise kann angenommen werden, dass sich durch geringere Adhäsionszeit größere Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen und weniger unspezifische FAK-Phosphorylierung ergeben.

4.2.5 WOW-1 Bindung

Eine zusätzliche Überprüfung der Aktivierung des Vitronektinrezeptors wurde mit dem WOW-1 [32] Antikörper vorgenommen, der spezifisch an den aktivierten $\alpha_V\beta_3$ Rezeptor, aber nicht an die CHO-K1 Zellen bindet. [25] Diese Untersuchung ist notwendig gewesen, da durch normale FACS Kontrollen keine Unterscheidung zwischen dem WT und den T562N Mutanten sichtbar war, da beide ähnliche Expressionslevels aufwiesen. In der Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe “Evidence for a differential functional regulation of the two β_3 -integrins $\alpha_V\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ ” wurde bereits der Aktivierungszustand des Vitronektinrezeptors mit dem WOW-1 AK getestet und die Mutanten der GFFKR Region wiesen keine spontane WOW-1 Bindung auf, was darauf deutet, dass der Vitronektinrezeptor inaktiviert worden war. Die spontane Bindung des WOW-1 in dieser Arbeit spricht für eine Reaktivierung des Vitronektinrezeptors. Sowohl $\alpha_{Del}\beta_3$ T562N als auch $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N exprimierende Zellen zeigten eine spontane Bindung des aktivierungsspezifischen Antikörpers WOW-1. Kashiwagi et al. untersuchten den Aktivierungszustand der $\alpha_{IIb}\beta_3$ T562N-Mutanten mit dem PAC1 AK, der als Pendant zum WOW1 zu sehen ist und der spontan an den aktivierten

Fibronectinrezeptor bindet. Die Mutation T562N der β_3 -Untereinheit verursachte die erste bis dahin beschriebene spontane Aktivierung des Fibrinogenrezeptors.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, herauszufinden, ob durch die zusätzliche T562N Mutation in der β_3 Untereinheit des Vitronektinrezeptors die deaktivierende Wirkung der Deletion oder Mutation (FF zu AA) der GFFKR-Region der α -Untereinheit aufgehoben werden kann. Besonderes Interesse galt der Frage, ob durch das Einbringen der β_3 T562N Mutation eine Wiederherstellung der Kommunikationsfähigkeit von $\alpha_v\beta_3$ mit dem Zytoskelett möglich ist. Um diesen Fragen nachgehen zu können, haben wir durch stabile Transfektion neue Zelllinien etabliert, die wir in vier Versuchen untersucht und miteinander verglichen haben.

1. Die Adhäsionsversuche haben gezeigt, dass das neu transfizierte Zellmodell eine deutlich stärkere Affinität zum Fibrinogen hat als die Negativkontrolle.
2. Die Flowchamberergebnisse legten dar, dass die CHO-K1 Zellen schon bei Flussgeschwindigkeit von $0,5 \text{ dynes /cm}^2$ abwaschbar sind. Der Wildtyp, sowie $\alpha_v\beta_3$ T562N, $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N und $\alpha_{\text{AA}}\beta_3$ T562N, wiesen ein deutlich stärkeres Bindungsverhalten auf.
3. In der Immunfluoreszenz war eine Stressactinfaserausbildung sichtbar.
4. Eine Zunahme der phosphorylierten Tyrosinkinase pp125^{fak} an der FAK, war bei den $\alpha_v\beta_3$ T562N, $\alpha_{\text{Del}}\beta_3$ T562N und $\alpha_{\text{AA}}\beta_3$ T562N Zellen zu beobachten.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die T562N Mutation in der β_3 Untereinheit des Vitronektins die deaktivierende Wirkung der Deletion oder Mutation (FF zu AA) der GFFKR-Region aufheben kann. Das Zytoskelett der stabil transfizierten Zellen ist als morphologisch aktiv zu betrachten.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Familie der Integrine, Humphries 1998	10
Abbildung 2, Kristallstruktur des Integrins, Xiong, Stehle, 2001.....	15
Abbildung 3, Agarose-Gel-Elektrophorese, Quelle: www.wikipedia.de	23
Abbildung 4, Replication Fork, www.bio.davidson.edu	27
Abbildung 5, Mutagenese-PCR, Gangolf Schrimp: Gentechnische Methoden....	30
Abbildung 6, FacsScan, Durchflusszytometrische Diagnostik	41
Abbildung 7, Flow chamber Arbeitsplatz	46
Abbildung 8, Vakuumpumpe(h)	46
Abbildung 9, Harvardpumpe mit 50 ml Perfusorspritze(i)	47
Abbildung 11, Komponenten der Flow Chamber	47
Abbildung 12, Schematischer Aufbau der Flowchamber, I.Ahrens, 2005	50
Abbildung 13, FACS-Ergebnis der CHO-K1 Zellen zur Negativkontrolle.....	62
Abbildung 14, FACS- Ergebnisse der $\alpha_V\beta_3$ T562N Klone Teil I.....	64
Abbildung 15, FACS- Ergebnisse der $\alpha_V\beta_3$ T562N Klone Teil II	65
Abbildung 16, Ergebnisse des Zellsortens der $\alpha_V\beta_3$ T562N Klone	65
Abbildung 17, FACS-Ergebnisse der $\alpha_{Del}\beta_3$ T562N Klone Teil I	66
Abbildung 18, FACS-Ergebnisse der $\alpha_{Del}\beta_3$ T562N Klone Teil II	67
Abbildung 19, Ergebnisse des Zellsortens der $\alpha_{Del}\beta_3$ T562 Klone	68
Abbildung 20, Ergebnisse der Expressionskontrolle der $\alpha_{AA}\beta_3$ T562N Klone....	69
Abbildung 21, Sequenzausschnitt des $\alpha_V\beta_3$ T562N, Medigenomix 2005.....	70
Abbildung 22, FACS-Kontrolle mit WOW 1	71
Abbildung 23, Extinktionsmessung, (n=3), Standardabweichung.....	72
Abbildung 24, Flowchamberergebnisse, (n=3), Standardabweichung	74
Abbildung 25, Repräsentative Bilder des Flowchamberversuches.....	75
Abbildung 26, Immunfluoreszenzbilder, Rhodaminaufnahmen 1-5, 1 = CHO-K1, 2 = Wildtyp, 3 = AlphaVBeta3 T562N, 4 = AlphaDelBeta3 T562N, 5 = AlphaAABeta3 T562N	77
Abbildung 27, Total pp125 ^{FAK} versus phosphorylierte pp125 ^{FAK}	78

7. Literaturverzeichnis

Ahrens I.G., N. Moran, K. Aylward, G. Meade, M. Moser, D. Assefa, D.J. Fitzgerald, C. Bode, K. Peter (2005) Evidence for a differential functional regulation of the two $\beta 3$ -integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha IIb\beta 3$, *Exp Cell Res* **312**, 925-37 , **10**

Babapull M et al. (2004) A hierarchical Bayesian metaanalysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents, *Lancet* **364**, 583-591, **2**

Bennett J.S., Gaston Vilaire et al (1982) Identification of the fibrinogen receptor on human platelets by photoaffinity labeling, *J. Biol. Chem* **257**, 8049-8054, **11**

Brooks P.C., R.A. Clark, D.A.. Chares (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science* **264**, 569-571, **26**

Butt Norra et al (2003) Disruption of the $\beta 3$ 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to $\beta 3$ integrins , *Blood* **102**, 2491-2497 , **22**

Diabendu Panda, Gopal C. Kundu, Benjamin I. Lee, Alessandro Peri, David Fohl, Isaac Chackalaparampil, Barid B. Mukherjee, Xiao D. Li, Diane C. Mukherjee, Stuart Seides, Joel Rosenberg, Karen Stark, Anil B. Mukherjee (1997) Potential roles of osteopontin and alpha v beta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9308-9313, **5**

Diamond, M. S., J. Garcia-Aguilar et al. (1993). "The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands." *J Cell Biol* **120**, 1031-1043, **6**

Elena G., Arias Salgado, Sergio Lizano, Sanford Shattil and Mark H. Ginsberg (2005) Specification of the Direction of Adhesive Signaling by the Integrin β

Cytoplasmic Domain, The Journal of Biological chemistry **280**, issue 33, 29699-29707 , **7**

Fielding-Habermann B., T.E. O'Toole, W. Smith E. Fransvea, Z.M. Ruggieri, H. Ginsberg, P.E. Hughes, Pampori, S.J. Shattil, A. Saven, B.M. Mueller (2001) Integrin activation controls metastasis in human breast cancer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**, No.4, 1853-1858, **1**

Fruehauf S., J.Topaly, A.Wilmes, Durchflusszytometrische Diagnostik maligner hämatologischen Erkrankungen, Onkologie, **Sonderdruck 2001**, Seite 1-3 , **31**

Gawaz, Meinrad (1999) Das Blutplättchen.Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung, Ein kurz gefasstes Lehrbuch, Thieme Stuttgart, New York, Seite 30ff, **8**

Ginsberg M. H., Anthony Patridge and Sandford J Shattil (2005) Integrin regulation, Current Opinion in Cell Biology **17**, 509-516, **19**

Hehrlein C., C. Bode (1998) Prävention und Behandlung der Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie, Kardiologie **87**, 699-706, **3**

Humphries M..J., E. J. Symonds et al (2003) Mapping functional residues onto integrin crystal structures, Curr Opin Struct Biol **13**, 236-143, **16**

Humphries M.. J. (2000) Integrin structure, Biochemical Society Transactions **28**, 311-339, **17**

Hynes R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, Cell **110**, 673-687, **29**

Kashiwagi Hirokazu et al.(1999) A Mutation in the extracellular Cysteine Rich Repeat Region of the $\beta 3$ Subunit activates Integrins $\alpha \text{Ib}\beta 3$ and $\alpha \text{V}\beta 3$. *Blood* **93**, 2559-2568, **9**

Lam, EF Plow, Se D`Souza, DA Cheresch, AL Frelinger and MH Ginsberg (1989) Isolation and characterization of a platelet membrane protein related to the vitronectin receptor, *J. Biol.Chem.* **264**, 3742-3749, **13**

Legendre P., A. Salsmann, J. Rayes, O. Trossard, N. Kieffer and D. Baruch (2006), CHO cells expressing the high affinity alpha IIBeta3 T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear, *J. of Thrombosis and Haemostasis* **4**, 236-246, **27**

Liaw at al (1995) The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* **95**, 713-724, **13**

Lottspech, F., Zorbas, H (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, **14**

Lu C. F. et al. (1997) The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1, *J. Immunol.*, **159**, 268-278, **4**

O`Toole, T. E., Katagiri, Y., Faull, R. J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (1994) Integrin cytoplasmatic domains mediate inside-out signal transduction, *J Cell Biol* **124**, 1047-59, **23**

O`Toole, T.E., Ylanne,J., and Culley, B.M. (1995) Regulation of integrin affinity states trough an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmatic domain. *J Biol Chem* **270**, 8553-8558, **24**

Pampor, N., Hato, T., Stupack, D. G. Aidoudi, S. Cheresch, D. A., Nemerow, G. R., and Shattil, S. J. (1999) Mechanism and consequences of affinity modulation of

integrin α V β 3 detected with a novel patch – engineered monovalent ligand, J Biol Chem **274**, 21609-16, **25**

Peter K., and Bode, C. (1996). A deletion in the α subunit locks platelet Integrin α IIb β 3 into high affinity state. Blood Coagu Fibrinolysis **7**, 233-236, **28**

Schrimpf, Gangolf (2002) Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Heidelberg, Berlin Seiten 3-250, **34**

Shattil S.J. (1995) Function and regulation of the β 3 integrins in hemostasis and vascular biology, Thromb Haemost. **74**, 149-155, **33**

Shimaoka Matomu, Timothy A. Springer (2003) Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. Nature **2**, 702-716 , **20**

Shintaro Suzuki, W. Scott Graves, Robert Pytela, Hiroharu Arai, Tom Krusius, Michael D. Piersbacher and Erkki Ruoslahti (1986) cDNA and amino acid sequences of the cell adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologues with other adhesion protein receptors, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **83**, 8614-8618, **30**

Stewart Mairi, Nancy Hogg (1995) Regulation of leukocyte integrin function: Affinity vs. avidity, Journal of Cellular Biochemistry **61**, 554-561, **18**

Strynadka N C J, M N G James (1989) Crystal Structure of the helix-loop-helix Calcium Binding Proteins, Annual Review of Biochemistry **58**, 951-999, **21**

Tadakoro Seiji, Sanford J. Shattil, Koji Eto, Vera Tai, Robert C. Liddington, Jose M. de Pereda, Mark Ginsberg, David A. Calderwood (2003), Talin Binding to Integrin β Tails: A final common Step In Integrin Activation, Science **302**, 103-106, **32**

Varner, J.A& Cheresch, D. A. (1996) Integrins and cancer. *Curr. Opin, Cell Biol* **8**, 724-730, **35**

Vinod Vijayan K., Trevor c. Huang, Yan Liu, Aubrey Bernardo, Jing-Fei Dong, Pascal J. Goldschmidt-Clermont, B. Rita Alevriadou, Paul F. Bray (2003) Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro 33 isoform of integrin $\beta 3$, *FEBS Letters* **540**, 41-46, **12**

www.bio.davidson.edu/Courses/immunology/Flash/RTPCR.html, **36**

Xiong, J.P., Thilo Stehle, Beate Diefenbach, Rongguang Zhang, Reinhardt Dunker, David L. Scott , Andrzej Joachimak, Simon L. Goodman, M. Amin Arnaout (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v \beta 3$, *Science* **294**, 339-345, **37**

8. Lebenslauf

Name: Jelica Heeskens

Adresse: Im Grün 16
79098 Freiburg

Geburtsdatum: 29. Juli 1977

Geburtsort: Sarajevo (Bosnien und Herzegovina)

Familienstand: verheiratet

Beruf: Krankenschwester

Schulausbildung:

Schule: 1984 – 1992 Gesamtschule Sarajevo
1992 – 1995 Realschule Weil der Stadt
1998 – 2001 Kolping Kolleg Freiburg

Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife (28. Juni 2001)

Hochschulausbildung:

Studienverlauf: seit Oktober 2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Freiburg

Physikum: 12. September 2003

Famulaturen: Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg

Kardiologie, Medizinische Universitäts- und Poliklinik Freiburg

Gastroenterologie- und Hepatologie, Medizinische Universität Wien Österreich

General Practice, Surgery, Anaesthetics, Gynaecology, Practice Dr. W.E. Weder, Windhoek Namibia

Praktisches Jahr: 1. Tertial Wahlfach Anästhesie, Uniklinik Freiburg

2. Tertial Chirurgie, Uniklinik Freiburg

3. Tertial Innere Medizin, Unispital Zürich

Promotion:

Experimentelle Arbeit in der Abteilung Innere Medizin
III der Universität Freiburg seit Herbst 2003

9. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Karlheinz Peter für die Überlassung der Thematik und die ausgezeichnete Möglichkeit, diese zu bearbeiten.

Herrn Dr. Ingo Ahrens danke ich für die engagierte Betreuung und die Einarbeitung in den Forschungsgegenstand sowie für die mehrfache Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Irene Neudorfer danke ich für die technische Beratung und für die moralische Unterstützung in frustrierenden Momenten des Laboralltags.

Ebenso danke ich meinen Mitdoktoranden für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Jörg Heeskens, der mich stetig ermuntert hat, weiter zu machen und der immer an mich geglaubt hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10 Publikation

Posterpräsentation der Dissertationsergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie am 14. April 2007 in Mannheim, Deutschland



Evidence for an alternative regulation of the activity of the β_3 -integrin $\alpha_V\beta_3$ in the absence of the highly conserved α -subunit GFFKR-motif

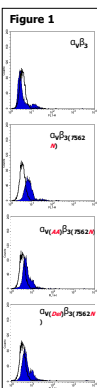
I Ahrens¹, J Heeskens¹, N Bassler², I Neudorfer¹, C Bode¹, K Peter²

¹ Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinik Freiburg, Deutschland
² Centre for Thrombosis and Myocardial Infarction, Baker Heart Research Institute, Melbourne, Australia

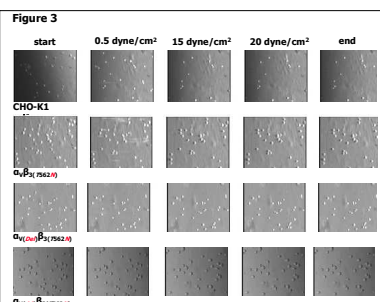


The highly conserved GFFKR motif is known to be crucial for the regulation of integrin function. $\alpha_V\beta_3$ is a major surface receptor on endothelial cells and involved in migration of smooth muscle cells, tumor metastasis, angiogenesis and arterial restenosis. We recently found a differential regulation of the β_3 -integrins via their GFFKR-motif [1]. Now we sought to determine whether introducing a mutation within the extracellular domain of β_3 , that is known to activate $\alpha_V\beta_3$, would restore its activity even in the absence of the GFFKR-

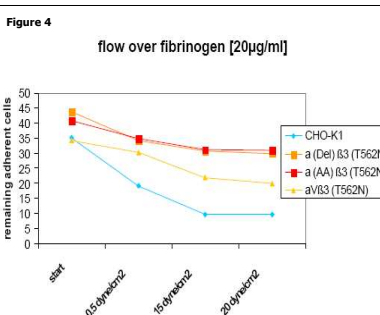
motif. Introduced the β_3 -integrin activating mutation 7562/N into the β_3 -subunit and transfected it together with previously generated plasmids for $\alpha_V(AA)$ and $\alpha_V(De)$ into CHO-K1 cells, thereby generating the double mutant cell lines $\alpha_V(AA)\beta_3(7562/N)$ and $\alpha_V(De)\beta_3(7562/N)$. Cells with a deletion (De) or a mutation (AA) within the GFFKR motif combined with the β_3 (7562/N) mutation showed spontaneous binding of the activation specific Fab-fragment WOW-1 in contrast to cells without the 7562/N mutation (Figure 1).



A parallel plate flow chamber (Glycotech) and fibrinogen coating were used for the analysis of the binding strength of the mutant cell lines. Prior to the application of increasing shear rates, the cells were allowed to interact with the fibrinogen coated matrix for 5 minutes at room temperature. Shear stress was applied for a total time of 6 minutes, with one minute at 0.5 dyne/cm², followed by four minutes at 15 dyne/cm², and finally one minute at 20 dyne/cm². The adherent cells were counted after 0.5 minutes, 3 minutes and 5 minutes of total flow respectively. Pictures from a representative flow chamber experiment are shown in Figure 3.

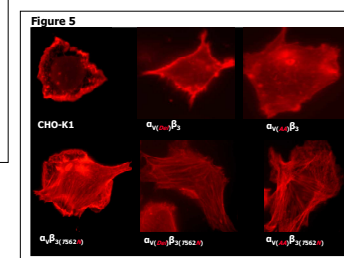


Reduction of adherent cells occurred mainly between low (0.5 dyne/cm²) and high (15 dyne/cm²) shear stress. Results of 3 independent experiments are summarized in Figure 4.



Prior to the end of the flow, 70% of the cells expressing the double mutation $\alpha_V(De)$ or $\alpha_V(AA)$ together with the $\beta_3(7562/N)$ mutation stayed adherent at 20 dyne/cm² in contrast to only 20% of the control CHO-K1 cells.

An intact cytoskeleton is a prerequisite for integrin mediated sustainable adhesion. The formation of actin stress fibers occurs as a result of integrin outside-in signaling. We used immunofluorescence-microscopy to detect actin stress fibers after adhesion to fibrinogen coated coverslips. Prior to adhesion coverslips were blocked with 1% BSA for 1h at 37°C. Cells were allowed to adhere for 60 minutes at 37°C respectively. After adhesion, the coverslips were washed with PBS. Cells were then fixed and permeabilized with 1% paraformaldehyd and 1% TritonX-100 at 4°C for 15min. After another wash with PBS the cells were stained with phalloidin-rhodamin for 20 minutes at room temperature and then analyzed with a zeiss immunofluorescence microscope and axiovision software. For each mutant cell line, immunofluorescence pictures of representative cells are shown in Figure 5.



As previously reported [1], $\alpha_V(De)\beta_3$ and $\alpha_V(AA)\beta_3$ expressing cells were unable to form actin stress fibers. However, introducing the $\beta_3(7562/N)$ mutation together with either $\alpha_V(De)$ or $\alpha_V(AA)$ into the CHO cell system restored actin stress fiber formation during adhesion to immobilized fibrinogen (Figure 5). This indicates, that the conformational changes related to the $\beta_3(7562/N)$ mutation override the lack (De) or mutation (AA) of the GFFKR-motif and restore cytoskeletal

The β_3 (7562/N) mutation caused activation of $\alpha_V\beta_3$ and restored cytoskeletal anchorage in the absence of the GFFKR-motif. Our cell model reveals a novel integrin activation mechanism and may allow to identify proteins that bind to integrin cytoplasmic tails independent of the GFFKR- motif.

[1] Ahrens T G. et al. Exp Cell Res. 2006. 312(6): 935-37

The functional activity of the mutant cell lines was assessed in a static adhesion assay to immobilized fibrinogen. The adhesion of $\alpha_V(De)\beta_3(7562/N)$ cells was increased 2-fold and the adhesion of $\alpha_V(AA)\beta_3(7562/N)$ was increased by 1.5 compared to the CHO-K1 control (Figure 2).

